

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
12 de Agosto de 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2004/067747 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
C07K 14/10

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/CU2003/000017

(22) Fecha de presentación internacional:  
19 de Diciembre de 2003 (19.12.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
2003-0031 31 de Enero de 2003 (31.01.2003) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTEC-  
NOLOGIA [CU/CU]; Departamento de Patentes, Ave. 31  
entre 158 y 190, Cubanacan, Playa, 10600 Ciudad de La  
Habana (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LÓPEZ  
QUESADA, Alina [CU/CU]; Av. 31, Edif. 18207, Apto:  
24, Playa, 12100 Ciudad Habana (CU). GONZÁLEZ  
BADILLO, Beatriz [CU/CU]; Calle186 # 3115, Apto:  
6A, Playa, 12100 Ciudad Habana (CU). SELMAN-HOU-  
SEIN SOSA, Guillermo [CU/CU]; Calle186 # 3115,  
Apto: 6A, Playa, 12100 Ciudad Habana (CU). HERNÁN-  
DEZ VELÁSQUEZ, Abel [CU/CU]; Calle 373, # 17843,  
Edif. 76, apto 33, Mulgoba, Boyeros., 19290 Ciudad de  
La Habana (CU). RÍOS BACALLAO, Javier [CU/CU];  
Calle 375 # 17817A, Mulgoba, Boyeros, 19290 Ciudad Ha-  
bana (CU). ROSABAL AYON, Yamilka [CU/CU]; Calle  
36, # 2308, Playa, 11300 Ciudad Habana (CU). PÉREZ  
MARTÍNEZ, Marlen [CU/CU]; Calle 11, # 407, hab. 13,  
Plaza, 10400 Ciudad Habana (CU). RODRÍGUEZ LAY,  
Licel [CU/CU]; Calle 312, # 2915, Rpto: Fraga, La Lisa,  
17100 Ciudad Habana (CU). GARCÍA GONZÁLEZ,  
Rolando [CU/CU]; Calle 2a, No. 18, entre Calle A y Calle  
B., Comunidad Científica, 70100 Camagüey (CU).

(74) Mandatario: VAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Ave. 31  
entre 158 y 190, Cubanacán, Playa., 10600 Ciudad de La  
Habana (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declaraciones según la Regla 4.17:**

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea  
concedida una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes  
designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG)
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) sólo para US

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: RECOMBINANT HEPATITIS A VIRUS ANTIGENS OBTAINED IN PLANT CELLS

(54) Título: ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A OBTENIDOS EN CELULAS VEGETALES

(57) **Abstract:** The invention relates to recombinant hepatitis A virus antigens obtained in plant cells. More specifically, the invention relates to the generation of genetic constructions based on modified fragments of the genome of hepatitis A virus (HAV), using strain M2 which has been isolated in Cuba. The nucleotide sequences of said fragments fused with suitable positioning and regulation signals are expressed in transgenic plants, giving rise to recombinant HAV antigens comprising pentamers and/or empty coats, which can generate an immune response.

(57) **Resumen:** Generación de construcciones genéticas basadas en fragmentos modificados del genoma del virus de la hepatitis A (VHA), utilizando la cepa M2, aislada en Cuba. Las secuencias nucleotídicas de estos fragmentos fusionados a señales de localización y de regulación apropiadas se expresan en plantas transgénicas, dando lugar a antígenos recombinantes del VHA, compuestos por pentámeros y/o envolturas vacías, capaces de generar una respuesta inmune.

WO 2004/067747 A1

BEST AVAILABLE COPY



**Publicada:**

— con informe de búsqueda internacional

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

## ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A OBTENIDOS EN CÉLULAS VEGETALES.

### Campo de la invención

- 5 Esta invención se relaciona con la rama de la biotecnología y más específicamente con la expresión de proteínas recombinantes en plantas transgénicas y su uso como antígenos vacunales. En particular se proporcionan antígenos recombinantes del virus de la hepatitis A obtenidos en plantas transgénicas a partir de la expresión de fragmentos modificados del genoma del virus HAV de la cepa M2 aislada en Cuba.
- 10 Se demuestra además la utilidad de los mismos para desarrollar respuesta inmune en animales luego de serle administrados estos por diferentes vías.

### Arte Previo

#### El Virus de la Hepatitis A.

- El genoma del VHA es ARN de simple cadena y polaridad positiva de  
15 aproximadamente 7.5 kb que codifica para una poliproteína de 253 kDa. (Cohen, J. I. y col., Journal of Virology (1987), 61:3035-3039). La poliproteína sufre procesos co y post-traduccionales, dando lugar a proteínas maduras estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4 Y 2A) y no estructurales (2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D).

- La proteasa 3C (P<sub>ro</sub>3C), presente en el dominio P3 de la poliproteína viral, es la  
20 proteasa que interviene en el clivaje de la poliproteína del VHA (Martín y cols., J Virol. (1999), 73(8):6220-7), permitiendo la liberación de los intermediarios P1-2A, 2BC y P3, los cuales son procesados posteriormente. Por lo tanto para que se formen adecuadamente las envolturas y ocurra la replicación del VHA es necesario que ocurra un procesamiento proteolítico diferencial de la poliproteína del VHA.
- 25 Durante el procesamiento de la región P3 solamente la unión 3C/3D es eficientemente cortada y existe un procesamiento retardado en los sitios 3A/3B y/o 3B/3C permitiendo la acumulación del polipeptido intermediario 3ABC (Kusov y cols., Journal of Virology (1999), 73:9867-9878), el cual corta el polipéptido P1-2A con similar eficiencia que la proteasa 3C propicia una mayor eficiencia en la
- 30 formación de los pentámeros. La forma característica del virus proviene de la unión de las proteínas virales, y su configuración tridimensional es importante para la generación de una respuesta inmunológica protectora. El virión del VHA presenta un sitio antigénico de neutralización inmunodominante que está estrictamente conservado entre cepas del VHA aisladas de diversas áreas geográficas. Está

formado por cinco epitopes conformacionales, tres de ellos en los pentámeros y dos que se forman una vez ensamblados los pentámeros para formar las envolturas. Se plantea que estos últimos epitopes se forman por cambios conformacionales en el sitio antigénico o por yuxtaposición de fragmentos de epitopes presentes en los pentámeros durante el ensamblaje de estos. Tanto los pentámeros como las partículas virales inducen anticuerpos neutralizantes y por tanto pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas (Stapleton y cols., Journal of Virology (1993), 67:1080-1085). Utilizando Baculovirus recombinantes que contenían el marco de lectura completo del VHA se expresó la poliproteína gigante del VHA además de otras proteínas intermediarias del procesamiento de esta en células de insectos (Stapleton y cols., The Journal of Infectious Diseases (1995), 171:9-14). También se construyeron virus vaccinia recombinantes, los cuales expresaron esta misma poliproteína del VHA en células de mamífero. Los extractos de células infectadas con estas construcciones genéticas mostraron que ocurría un procesamiento post-traducciona l de la poliproteína dando lugar a envolturas similares a las del VHA (Winokur y cols., Journal of Virology (1994), 65:5029-5036). Existen patentes que describen variantes de vacunas recombinantes contra VHA expresadas en sistemas de baculovirus y vaccinias, tales como: solicitud de patente No WO9301279 Winokur y cols; 21 de Enero de 1993.; patente No US5294548 (McLinden y col., marzo 1994); solicitud de patente WO09844122 (Probst, August 27, 2002); solicitud de patente WO9111460 y patente US5605692 (Thomas y col., 25 de Febrero de 1997), donde se utilizan las secuencias del marco de lectura abierto completo (MLA) para la producción de envolturas y pentámeros inmunogénicos y se reivindican los métodos para la obtención de envolturas del VHA, expresando las regiones estructurales y la región P3 en una orientación cis, trans y en construcciones bicistronicas.

#### **Plantas transgénicas como biorreactores.**

Las primeras plantas transgénicas originadas a partir de la transferencia de genes mediada por la rizobacteria *Agrobacterium tumefaciens* se produjeron a principios de la década de los 80 (Zambryski y cols, EMBO J. (1983), 2: 2143-2150), empleándose esta tecnología inicialmente como una forma de lograr la resistencia a microorganismos patogénicos (Powell y cols., Science (1986), 232: 738-743 ), a insectos (Vaeck y cols., Nature (1987), 328: 33-37), y a herbicidas (De Block y cols., 1987, EMBO J. 6: 2513-2518). Pero la demostración de la capacidad de las células

vegetales de ensamblar correctamente proteínas foráneas de una alta complejidad estructural indicó rápidamente su posible valor como una nueva estrategia de escalado para la producción económica de proteínas recombinantes de interés industrial y biofarmacéutico (Barta y cols., Plant Mol. Biol (1986), 6: 347-357; 5 Cramer y cols., Ann. N Y Acad. Sci. (1996), 792: 62-71; Staub y cols, Nature Biotechno. (2001). 18: 333-338).

En 1992, se introdujo un nuevo concepto en la producción de vacunas de subunidades debido a la demostración de que plantas transgénicas podían expresar el antígeno de superficie de hepatitis B (AgsHB). En las bases de esos hallazgos se pensó en la idea que las plantas podrían ser usadas para producir candidatos 10 vacunales en tejidos comestibles y lograr inmunizar solamente consumiendo estos tejidos, de esta forma aparece la denominación de "vacunas comestibles" (Arntzen y cols., Plants.Vaccine (1994), 94:339-344. Posteriormente se demostró que ratones alimentados con papas transgénicas conteniendo el AgsHB mostraron una 15 respuesta inmune primaria que es similar a la que se obtiene cuando se administra una dosis única de la vacuna comercial intraperitonealmente, indicando que la expresión de antígenos en tejidos comestibles de plantas puede ser considerada como una nueva vía de inmunización (Richter y col., Nature Biotechnology (2000), 18:1167-1171).

Existen varias patentes que describen el uso de las plantas para la expresión de 20 vacunas, tales como: patente No US5484719 (Lam y col., Enero 16, 1996); patente No US5612487 (Lam y col., Enero 16, 1996); patente No US5914123, divisional de la patente No US5612487 y continuación en parte de la solicitud de patente No PCT/US94/02332 (Arntzen y col. Junio 22, 1999); patente No US6136320 (Arntzen y 25 col. Junio 22, 1999); solicitud de patente WO9612801 (Arntzen y col. mayo 28, 2002) y la solicitud de patente No US2002006411 (Lam y col. 4 de Junio, 2002). Los documentos anteriormente señalados describen además del uso de las plantas como vacunas, la expresión del AgsHB en plantas y en algunos casos utilizan el termino "hepatitis viral" para referirse al virus de la hepatitis B (VHB). El VHB difiere 30 significativamente del virus de la hepatitis A con características muy diferentes y por tanto pertenecen a distintos géneros desde el punto de vista taxomónico. Para lograr proteínas recombinante del VHA capaces de levantar una respuesta inmunológica importante es necesario expresar varias proteínas del genoma viral y luego lograr que se formen partículas tales como pentámeros o envolturas vacías.

El procesamiento y la formación de partículas inmonogénicas, solamente se ha logrado en sistemas eucarióticos como vaccíneas y baculovirus y no en sistemas más sencillos como en levaduras. En plantas transgénicas no se han expresados antígenos con la complejidad del VHA. En el caso del VHB, el antígeno está  
5 formado por una sola proteína y es particulado eficientemente en sistemas eucariótico simples, como levadura. Por lo anteriormente expuesto creemos que la expresión del AgsHB no abarca la expresión de pentámeros o envolturas vacías del VHA en plantas. En otras solicitudes de patentes se describen específicamente la expresión de diferentes antígenos virales, tales como el del virus del papiloma  
10 humano en la solicitud de patente No WO0161022 de Sohn y col. del 23 de agosto del 2001; el del virus de la fiebre aftosa en la solicitud de patente No CN1319670 de Zhong y col. del 31 de octubre del 2001; de los rotavirus en la solicitud de patente WO0159070 de Lee y col. del 16 de Agosto del 2001 y el del virus del gumboro en la solicitud de patente No WO0197839 de Shachar y col. del 27 de Diciembre del  
15 2001.

La producción de proteínas recombinantes en plantas ofrecen muchas ventajas potenciales para generar compuestos farmacéuticos o vacunas de importancia en la medicina clínica. En primer lugar, los sistemas vegetales son más económicos que la infraestructura industrial utilizada en sistemas de fermentación o en biorreactores.  
20 En segundo lugar, ya está disponible la tecnología para cosechar y procesar plantas y sus productos a escala industrial. En tercer lugar, el requisito de la purificación del compuesto puede ser eliminado cuando el tejido de la planta que contiene la proteína recombinante se utiliza como alimento (como en el caso de las vacunas comestibles). En cuarto lugar, se puede dirigir las proteínas recombinantes a  
25 determinados compartimientos intracelulares (como mitocondrias, vacuolas, cloroplastos y retículo endoplasmático), o expresarlos directamente en esos compartimientos (como por ejemplo el cloroplasto). En quinto lugar los riesgos a la salud que se presentan por posible contaminación del producto recombinante con patógenos humanos son mínimos. Finalmente las plantas como sistema de  
30 expresión de proteínas recombinantes de importancia farmacéutica tienen como ventaja además que muchos de los pasos de la vía secretora, incluyendo plegamiento, ensamblaje, glicosilación al nivel de retículo endoplasmático son similares a las células de mamíferos (Ma y Hein, , Plant Physiol. (1995), 109: 341-346; Rayon y cols., J. Exp. Bot. (1998), 49: 1463-1472.; Sanderfoot y Raikhel, Plant

Cell. (1999), 11: 629-641; Vitale y Denecke, Plant Cell (1999), 11: 615-628; Lerouge y cols., Pharmaceutical Biotechnology (2000), 1: 347-354).

### **Descripción detallada de la invención**

- 5 El diseño base del objeto de esta invención se apoya en construcciones genéticas que permiten la expresión combinada de genes que codifican para diferentes variantes de proteínas estructurales y regiones no estructurales mutadas, dirigidas a la expresión recombinante en plantas transgénicas de pentámeros y envolturas antigénicas del VHA capaces de generar una respuesta inmune.
- 10 La novedad de nuestra invención radica fundamentalmente en las regiones del genoma viral que se emplean para la conformación de un marco de lectura abierto nuevo que codifica para una poliproteína de tamaño menor, conformada por las regiones estrictamente estructurales (solamente hasta la proteína 2A) y la proteasa viral modificada, la cual presenta una talla superior a la proteasa 3C del virus debido
- 15 a que los sitios de cortes entre las proteínas 3A/3B y 3B/3C están mutados. La expresión de envolturas virales y pentámeros del VHA en el citosol y en el retículo endoplasmático de plantas transgénicas se logra por primera vez, significándose la efectividad de las señales promotoras y reguladoras para la expresión de estas en plantas. La formación de pentámeros y envolturas en el retículo endoplasmático
- 20 producto de la expresión combinada de la región estructural y la región responsable de la proteólisis demuestra las posibilidades de este compartimiento para el ensamblaje y el almacenamiento de estructuras complejas, como es el caso del VHA. La producción de pentámeros y envolturas en plantas nos permite la posibilidad del empleo de estas como biorreactores para la obtención de una vacuna
- 25 barata y segura.
- La invención está demostrada mediante los ejemplos en los cuales se usaron plantas transgénicas de tabaco, arroz y zanahoria para la obtención por primera vez de envolturas y pentámeros inmunogénicos del virus en células vegetales.
- Las envolturas y pentámeros del HAV resultantes de la invención pueden ser
- 30 usados como antígenos vacunales y además en ensayos diagnósticos para la detección de HAV.

### **Construcciones genéticas.**

### **Obtención del cADN del VHA.**

A partir del ARN de la cepa M2 del VHA aislada en Cuba, se amplificó la secuencia nucleotídica que codifica para el marco de lectura abierto (MLA) del virus, utilizando la técnica de Transcripción Reversa- Reacción en cadena de la Polimerasa (TR- RCP). Este fragmento se clonó en un plásmido y fue determinada su  
5 secuencia nucleotídica, la cual presenta diferencias que generan variaciones en 11 residuos aminoacídicos con respecto a las secuencias reportadas. El análisis de estas secuencias permite clasificar a la cepa M2 dentro del subgenotipo IA, al cual pertenecen casi la totalidad de las cepas americanas. A partir del genoma de esta cepa se diseñaron y construyeron fragmentos modificados que se utilizaron en las  
10 diferentes construcciones genéticas que son objeto de esta invención.

**Construcciones genéticas de vectores para la expresión de envolturas y pentámeros en plantas transgénicas.**

**Proteasa recombinante de VHA.**

Para que se formen las envolturas virales es necesario que ocurra un  
15 procesamiento proteolítico diferencial de la poliproteína, que permita la liberación ordenada de las proteínas virales. La eficiencia de la formación de la envoltura aumenta cuando el intermediario 3ABC está presente debido a la interacción hidrofóbica de la proteína 3AB con la membrana y las proteínas virales.

Para obtener un polipéptido 3ABC del cual no se libere la proteasa 3C y que a su  
20 vez conserve su función proteolítica, necesaria para formación de los pentámeros y envolturas del VHA, se mutaron los sitios de cortes de la proteasa 3C entre la proteínas 3A/3B, glutámico por valina y 3B/3C, serina por leucina respectivamente. Ese polipéptido se empleó en el diseño de novedosas y diferentes estrategias para la expresión de las proteínas del VHA formadoras de envolturas y pentámeros  
25 inmunogénicos.

**VHA recombinante para la expresión de envolturas y pentámeros en el citosol de la célula vegetal.** En el VHA, el polipéptido P1-2A tiene una función importante en la formación de la envoltura viral. En este polipéptido existen dos señales que regulan la formación de la envoltura. En el dominio carboxilo terminal de este  
30 polipéptido se encuentra la proteína 2A, que se requiere en las primeras etapas del ensamblaje de las envolturas para lograr la formación de los pentámeros a partir de la unión de cinco moléculas del polipéptido P1-2A aún sin procesar. La proteína VP4 se requiere en una segunda etapa para la asociación de los pentámeros y la formación de las envoltura.

Para la expresión de la poliproteína modificada en el citosol de la célula vegetal, se construyeron vectores que contienen la secuencia del marco de lectura abierto modificado (MLAm), que codifica para una poliproteína significativamente menor que la poliproteína original del VHA. Esta secuencia es el resultado de la fusión de la  
5 secuencia que codifica para el polipéptido P1-2A y la secuencia que codifica para la proteasa 3ABC mutada.

El vector plasmídico utilizado para la transformación de plantas, mediante *A. tumefaciens* contiene secuencias de ADN que codifican para proteínas del VHA fusionadas a las secuencias nucleotídicas reguladoras de la expresión en plantas.  
10 En este caso la secuencia que codifica para la proteína no se encuentra fusionada a ninguna señal específica de transporte a través de la vía secretora de la célula vegetal, por lo que se expresa en el citosol de la célula

**VHA recombinante para la expresión exclusivamente de pentámeros en el citosol de la célula vegetal.** Como se ha descrito anteriormente la proteína VP4  
15 como parte del polipéptido VP0 se requiere para la asociación de los pentámeros y la formación de las envolturas virales.

De la secuencia nucleotídica codificante para la poliproteína MLAm se eliminó el fragmento que codifica para la proteína VP4, dando lugar a una secuencia denominada  $\Delta$ MLAm. Se construyó un vector plasmídico para la expresión en el  
20 citosol de la célula vegetal donde la secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína  $\Delta$ MLAm se fusionó a las secuencias que regulan la expresión en plantas y se usó para la obtención de plantas transgénicas mediante la infección con *A. tumefaciens* de hojas de tabaco, arroz y zanahoria. La poliproteína expresada con esta construcción genética es de una talla significativamente menor y  
25 es capaz de procesarse y formar exclusivamente pentámeros virales inmunogénicos. El tamaño menor de los pentámeros con respecto a las envolturas permite lograr mayores niveles de expresión ya que provoca en la célula vegetal una menor carga metabólica. El producto obtenido es igualmente factible de ser empleado como inmunógeno para el desarrollo de vacunas.

30 **VHA recombinante para la expresión de envolturas y pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.**

La acumulación de proteínas heterólogas en el retículo endoplasmático en plantas, se logra mediante el uso de secuencias señales para dirigir estas a la vía secretora, y por tanto al retículo endoplasmático y de señales de retención en este organelo.

Se empleó como péptido señal, una secuencia que codifica para el péptido N-terminal de la esporamina del boniato. Como señal de retención de proteínas en el retículo endoplasmático se utilizó la secuencia que codifica para el péptido KDEL localizado en el extremo carboxilo de la proteína.

- 5 La secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido P1-2A, se fusionó en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y por su extremo 3' a la secuencia que codifica para un péptido espaciador unida a su vez a la secuencia que codifica para el péptido KDEL. El fragmento de ADN resultante se colocó bajo señales de regulación de la expresión en plantas y se
- 10 clonó en un vector binario para su expresión en plantas. En este mismo vector binario se introdujo la secuencia que codifica para el polipéptido mutado 3ABC igualmente fusionado en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y en su extremo 3' a la secuencia que codifica para el péptido KDEL y bajo las señales de regulación para la expresión en plantas.
- 15 Los dos polipéptidos se localizan en el retículo endoplasmático y la proteasa 3ABC es capaz de procesar el polipéptido P1-2A y lograr una eficiente formación de partículas.

**VHA recombinante para la expresión exclusivamente de pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.**

- 20 A la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido P1-2A se le eliminó la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína VP4 y se obtuvo un polipéptido  $\Delta$ P1-2A. Esta secuencia se fusionó en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y por su extremo 3' a la secuencia que codifica para un péptido espaciador unida a su vez a la
- 25 secuencia que codifica para el péptido. En este mismo vector binario se introdujo la secuencia que codifica para el polipéptido mutado 3ABC igualmente fusionado en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y en su extremo 3' a la secuencia que codifica para el péptido KDEL y bajo las señales de regulación para la expresión en plantas. Los dos polipéptidos se
- 30 localizan en el retículo endoplasmático y la proteasa 3ABC es capaz de procesar el polipéptido  $\Delta$ P1-2A y lograr la expresión de pentámeros exclusivamente. Estas plantas exhiben mayores niveles de expresión y un mejor crecimiento y desarrollo, lo que conlleva a la obtención de mayor biomasa.

### **Identificación de las plantas transgénicas que expresan el producto de los genes del VHA modificado.**

El *A. tumefaciens* se transformó con cada uno de los vectores binarios y se obtuvieron colonias bacterianas que contenían estos plásmidos. El *A. tumefaciens*,  
5 conteniendo las diferentes construcciones genéticas por separados, se utilizaron para la transformación de plantas y finalmente la obtención de plantas resistentes a la kanamicina como marcador de selección. La integración del ADN en las plantas se comprobó por las técnicas de Southern blot y PCR .

A partir de hojas de plantas transgénicas se realizó la extracción de las proteínas  
10 solubles, macerando estas con nitrógeno líquido en un tampón de extracción de proteínas. Las envolturas y pentámeros se identificaron utilizando antisueros específicos al VHA y un anticuerpo monoclonal neutralizante, mediante el uso de técnicas inmunoquímicas, tales como Western blot, Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) o Inmunomicroscopía, demostrándose que las plantas transgénicas  
15 expresan la poliproteína o en algunos casos los polipéptidos esperados y que estos son procesados y ensamblados en pentámeros o envolturas.

Las plantas que expresaron mayores niveles de proteína recombinante se utilizaron para la purificación de las envolturas y los pentámeros utilizando para ello un anticuerpo monoclonal neutralizante.

### **20 Determinación de la inmunogenicidad de las envolturas y pentámeros purificados.**

La inmunopotencia de las envolturas y pentámeros del VHA fueron determinadas por la respuesta inmunológicas de los ratones, inmunizados con el producto purificado a partir de hojas de plantas de tabaco y arroz. y de ratones alimentados  
25 con zanahorias transgénicas que expresan el antígeno del VHA. Los métodos para la introducción del antígeno fueron la vía oral y parenteral. La respuesta inmune fue controlada y verificada utilizando la técnica de ELISA para determinar la reactividad del antisuero del animal ante el VHA y por la capacidad del suero inmune de neutralizar el VHA infeccioso *in vitro*.

### **30 VENTAJAS DE LA INVENCION**

Dentro de las ventajas más importantes que ofrece nuestra invención se encuentra: la similitud antigénica entre las envolturas y pentámeros purificados producto de la expresión de nuestras construcciones y el virus original; los niveles de expresión de envolturas y pentámeros productos de las construcciones que reivindicamos son

mayores en plantas que las obtenidas cuando se expresa el marco de lectura abierto del VHA o se coexpresa la región P1-2A y la región P3, ya que la poliproteína obtenida producto de la expresión de nuestras construcciones es de una talla significativamente menor a la del virus original; el polipéptido 3ABC, está compuesto exclusivamente por las proteínas 3A, 3B y 3C y tiene mutados los sitios de auto procesamiento entre las proteínas 3A/3B y 3B/3C, que evita que ocurra el procesamiento de este polipéptido y por lo tanto la función proteolítica de la poliproteína es asumida por el mismo con mayor eficiencia; los niveles de expresión de pentámeros y envolturas virales del VHA, en el retículo endoplasmático de la célula vegetal son mayores que en el citosol; la expresión exclusivamente de pentámeros en la célula vegetal es más eficiente y permite un mejor crecimiento y desarrollo de la planta, debido a que estas partículas son de menor tamaño; el escalado y producción de proteínas de uso farmacéutico a partir de plantas es factible para producir grandes cantidades de antígenos; los costos de producción disminuyen con relación a otros sistemas empleados y descritos en el estado del arte; la expresión en plantas del antígeno del VHA disminuye los riesgos de contaminación con patógenos que afectan a los seres humanos; la inmunización oral contra el VHA contribuye significativamente a abaratar los costos de la inmunización por la posibilidad de usar las plantas sin necesidad de purificar completamente el producto.

#### **Depósito de microorganismos**

Los plásmidos pBvHARE, pBΔVHARE, pBMLAm y pBΔMLAm fueron depositados bajo el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos en el *Belgian Coordinated collection of Microorganisms BCCM, LMBP-COLLECTION* con número de acceso LMBP 4721; LMBP 4722; LMBP 4723 y LMBP 4724 respectivamente el 19 de mayo, 2003.

#### **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.**

Figura 1. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el citosol de la célula vegetal. A) Esquema del MLA de la cepa M2 del VHA. B) Esquema de las secuencias que codifican para las proteínas estructurales (P1-2A) C) Esquema de las secuencias que codifican para la región 3ABC. D) Esquema del MLAm del VHA. E) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en plantas.

Figura 2. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el citosol de la célula vegetal. A) Esquema del  $\Delta$ MLAm sin la secuencia que codifica para VP4. B) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en plantas de  $\Delta$ MLAm.

5    Figura 3. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal. A) Esquema de la secuencia P1-2A fusionada a la secuencia KDEL. B) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en el retículo endoplasmático. E- Espaciador, K- KDEL

10    Figura 4. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal. A) Esquema de la secuencia P1-2A, sin la secuencia VP4 y fusionada a la señal KDEL. B) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en plantas. E- Espaciador, K- KDEL

Figura 5. Southern blot de ADN genómico de plantas transgénicas de tabaco.

15    Figura 6. Southern blot de ADN de plantas transgénicas de zanahoria y arroz amplificado mediante RCP.

Figura 7. Western blot de proteínas de plantas transgénicas de tabaco, zanahoria y arroz, transformadas con construcciones genéticas para la expresión en citosols de envolturas y pentámeros.

20    Figura 8. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) realizado a las plantas de tabaco, zanahoria y arroz, transformadas con construcciones genéticas para la expresión en citosols de envolturas y pentámeros del VHA.

Figura 9. Inmunomicroscopía electrónica de una planta de tabaco, transformada con la construcción pBMLAm. A) planta no transformada. B) planta transformada. C)

25    Planta transformada.

Figura 10. ELISA de inhibición de los sueros de ratones inmunizados por vía intraperitoneal con pentámeros del VHA purificados a partir de plantas de arroz y tabacos.

Figura 11. ELISA de inhibición de los sueros de ratones inmunizados oralmente con pentámeros del VHA purificados a partir de plantas de arroz y tabacos.

30    Figura 12. ELISA de inhibición de los sueros de ratones inmunizados oralmente mediante la alimentación de los mismos con zanahorias, cosechadas a partir de plantas que expresan pentámeros del VHA.

**EJEMPLOS.****Ejemplo 1. Clonación del MLA del VHA de la cepa cubana M2.**

La secuencia de interés del plásmido pMLA1 se muestra en la Figura 1(A). A partir de la cepa M2 del VHA aislada y caracterizada en Cuba, se purificó el ARN y se amplió un fragmento de ADN de 6,7 kb mediante la técnica de Transcripción Reversa- Reacción en cadena de la Polimerasa (TR- RCP), utilizando oligonucleótidos específicos (SEQ ID NO 1 y 2) para otras secuencias reportadas del VHA. La banda fue clonada en un vector BlueScript (KS+), digerido previamente con la enzima *Sma*I. El plásmido resultante se denominó pMLA1 y se utilizó para la secuenciación nucleotídica del MLA de VHA de la cepa M2 cubana. La secuencia de ADN (SEQ ID NO 3) presenta cambios con respecto a las reportadas que generan 11 cambios aminoacídicos. El análisis de estas secuencias permite clasificar a la cepa M2 dentro del subgenotipo IA, al cual pertenecen casi la totalidad de las cepas americanas. Esta secuencia confirma que la cepa cubana M2 es realmente una cepa del VHA diferente a las anteriormente reportadas.

**Ejemplo 2. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el citosol de la célula vegetal.**

La secuencia de interés del plásmido pP1-2A se muestra en la Figura 1(B). Este plásmido se obtuvo amplificando la secuencia que codifica para las proteínas estructurales (P1-2A) mediante la técnica de RCP, utilizando oligonucleótidos específicos (SEQ ID NO 4) complementarios para las regiones 5' que codifica para la proteína VP4 y la región 3' de la secuencia que codifica para la proteína 2A respectivamente a partir del plásmido pMLA1. La banda amplificada de 2,5 kb (SEQ ID NO 6) se clonó en el vector BlueScript (KS+) digerido *Sma*I.

Para la obtención del plásmido p3ABC, cuya secuencia de interés se muestra en la Figura 1 (C), se amplió mediante RCP la secuencia de 0,2 kb que codifica para la proteína 3A, utilizando oligonucleótidos (SEQ ID NO 7 y 8) complementarios para la región 5' y 3' de este gen y se clonó en un vector BlueScript (KS+), digerido con la enzima *Bam*HI-*Eco*RV. Seguidamente en este mismo vector se clonó en los sitios *Eco*RV-*Xba*I, una secuencia nucleotídica sintética (SEQ ID NO 9 y 10) que codifica para la proteína 3B, obteniéndose el plásmido p3AB. Por otra parte a partir del plásmido pMLA1, se amplió mediante RCP, la secuencia de 0,65 kb que codifica para la proteína 3C, donde se utilizaron los oligonucleótidos SEQ ID NO 11 y 12. Esta banda se clonó en el vector P3AB en los sitios *Xba*I-*Hind*III. Como

resultado se obtuvo una secuencia 3ABC (SEQ ID NO 13), que codifica para una poliproteína con actividad proteolítica y sin posibilidades de auto procesamiento debido a que los sitios de corte entre las proteínas 3A/B y 3B/C están mutados, mediante la sustitución de los nucleótidos T por C y G por C respectivamente.

- 5 La secuencia de interés del plásmido pMLAm se muestra en la Figura 1(D). Para obtener este plásmido se digirió el plásmido pP1-2A con las enzimas *EcoRI* y *ClaI* y se clonó en este vector la banda de 1 kb codificante para el polipéptido 3ABC mutada, sacada mediante una digestión con las enzimas *EcoRI-ClaI*. Este plásmido contiene la secuencia modificada que codifica para la poliproteína de VHA de una
- 10 talla significativamente menor a la poliproteína original (SEQ ID NO 14).

El plásmido pKMLAm, se obtuvo clonando la banda MLAm de 3,4 kb, digerida con las enzimas *SmaI-ClaI*, en el vector pKTPL-2, el cual contiene las secuencia promotora 2x 35S del CaMV, la secuencia líder del TEV y el terminador 35S del CaMV. El plásmido pKTPL-2 se digirió con las enzimas *NcoI-Klenow-ClaI*.

- 15 La secuencia de interés del plásmido binario pBMLAm se muestra en la Figura 1(F). Este plásmido se obtuvo digiriendo el plásmido pKMLAm con las enzimas *SphI*, y posteriormente tratado con nucleasa *mung bean*, resultando una banda de 4,7 kb que se clonó en el vector binario pBin19, digerido con la enzima *SmaI*.

El plásmido resultante pBMLAm por lo tanto contiene: el gen neomicin

20 fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección, la kanamicina; el gen MLAm, que codifica para la poliproteína modificada del VHA, regulado por el promotor 2X 35S, el líder del TEV, el terminador del CaMV y la secuencia nucleotídica de los bordes derecho e izquierdo del T-ADN, por la cual se transfieren estos genes al genoma de la planta.

- 25 **Ejemplo 3. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el citosol de la célula vegetal.**

La secuencia de interés del plásmido p $\Delta$ MLAm se muestra en la Figura 2(A). Para eliminar la proteína VP4 y obtener este plásmido, se eliminó el fragmento de 114 pb del plásmido pMLAm cortando con las enzimas *SmaI-PstI* y se sustituyó por la

30 secuencia nucleotídica sintética (SEQ ID NO 15 y 16) que restituye el inicio del gen que codifica para la proteína VP2. La secuencia de la región  $\Delta$ MLAm corresponde a la SEQ ID NO 17. El plásmido pK $\Delta$ MLAm, se obtuvo clonando la banda  $\Delta$ MLAm (3,46 kb) digerida con las enzimas *SmaI-ClaI*, en el plásmido pKTPL-2 digerido *NcoI-Klenow-ClaI*

La secuencia de interés del plásmido binario pBΔMLAm se muestra en la Figura 2(B), se obtuvo digiriendo el plásmido binario pBin19 con las enzimas *Sma*I y se clonó en este vector un fragmento de ADN de 4,6 kb resultante de la digestión del plásmido pKMLAm con las enzimas *Sph*I y tratado con nucleasa *mung bean*.

- 5 El plásmido resultante pBΔMLAm contiene: el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección, la kanamicina; el gen MLAm, que codifica para la poliproteína modificada del VHA, regulado por el promotor 2X 35S, la secuencia líder del TEV, el terminador 35S del CaMV y la secuencia nucleotídica de los bordes derecho e izquierdo del T-ADN, por la cual se transfieren estos genes  
10 al genoma de planta.

**Ejemplo 4. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.**

- La secuencia de interés del plásmido pBVHARE se muestra en la Figura 3B. Para la obtención de este plásmido se clonó el fragmento sintético (SEQ ID NO 18 y 19)  
15 que codifica para la señal de retención en el retículo endoplasmático (KDEL), en el vector BS(+) en los sitios *EcoRV*-*Cla*I. Por otra parte en el sitio *StyI*-*EcoRI* del plásmido pP1-2A se clonó un fragmento sintético (SEQ ID NO 20 y 21) que modifica el extremo 3' de la proteína 2A eliminando el sitio de corte de la proteasa en esta región e introduciendo una secuencia que funciona como espaciador entre la unión  
20 del gen y la secuencia que codifica para la señal KDEL. Seguidamente se sacó esta secuencia (2,5 kb) con las enzimas *Sma*I-*EcoRV* y se clonó en el vector BS-KDEL, resultando el plásmido pP1-2ARE (Figura 3A, SEQ ID NO 22). El plásmido p3ABCRE se obtuvo digiriendo el plásmido p3ABC con las enzimas *Xho*I/Klenow-*EcoRI* y clonando la secuencia 3ABC en los sitios *EcoRI*-*EcoRV*. (Figura 3A, SEQ ID  
25 NO 23).

- Para dotar a los genes de interés de señales reguladoras de la expresión en plantas, se clonaron por separados la región estructural P1-2A- KDEL (2,5 kb), extraída del plásmido pP1-2ARE con las enzimas *Sma*I-*Cla*I, en el plásmido pKTPL-2 digerido *Nco*I/Klenow-*Cla*I, resultando el plásmido pKP1-2ARE. La región  
30 3ABC-KDEL de 1 kb se sacó del plásmido p3ABCRE con las enzimas *Nco*I-*Cla*I y se clonó en el plásmido pKTPL-2 digerido con las mismas enzimas, resultando el plásmido pK3ABCRE. Finalmente, para lograr el plásmido para la transformación de plantas mediante *A. tumefaciens* se digirió el vector binario pBin 19 con la enzima *Sal*I, y en este sitio se clonó la secuencia de 2 kb, extraída del plásmido

pK3ABCRE, digerido con la enzima *SaI*. Como resultado se obtuvo el plásmido pB3ABCRE. Seguidamente se clonó en este mismo vector, en el sitio *SphI* el casete de expresión correspondiente a la secuencia P1-2A-KDEL, extraído del plásmido pKP1-2ARE, luego de una digestión *SphI*. El plásmido resultante el  
5 pBVHARE porta las regiones estructurales y la región con función proteolítica por separadas, fusionadas a la señal de retención en el retículo y bajo las señales de regulación de la expresión en plantas y el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección.

**Ejemplo 5. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el  
10 retículo endoplasmático de la célula vegetal.**

La secuencia de interés del plásmido p $\Delta$ VHARE se muestra en la Figura 4B. Para la obtención de este plásmido se digirió el plásmido pP1-2ARE con las enzimas *SmaI-PstI* y se sustituyó este fragmento por la secuencia nucleotídica sintética (SEQ ID NO 15 y 16), restituyéndose el extremo 5' del gen que codifica para la proteína  
15 VP2. Este plásmido resultante p $\Delta$ P1-2ARE (Figura 4A, SEQ ID NO 24), se digirió *SmaI-ClaI* y se clonó una banda de 2,4 kb en el vector pKTPL-2 digerido *NcoI/K-ClaI*, resultando el plásmido p $\Delta$ P1-2ARE. Seguidamente se clonó en el plásmido pB3ABCRE (el vector binario que contiene la región 3ABC-KDEL), el casete de expresión de 4,5 kb, a partir del plásmido p $\Delta$ P1-2ARE. digerido con la enzima  
20 *SphI*,

El plásmido binario resultante contiene: la región estructural sin la secuencia que codifica para la proteína VP4 fusionada a la secuencia que codifica para el péptido KDEL, bajo las señales de regulación de la expresión en plantas; la región 3ABC-KDEL bajo estas mismas señales y el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el  
25 cual codifica para el marcador de selección.

**Ejemplo 6. Obtención de envolturas y pentámeros del VHA en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*.**

La transformación genética de plantas de *Nicotiana tabacum* se llevó a cabo siguiendo el método de Zambryski y colaboradores (1983). Para ello se transformó  
30 la cepa AT 2260 (Deblaere y cols., 1985) de *Agrobacterium tumefaciens* por el método del nitrógeno líquido (Hofgen y Willmitzer, 1988) con los plásmidos binarios desarrollados (p $\Delta$ VHARE, pBVHARE, p $\Delta$ MLAm, pBMLAm) y con los recombinantes se transformaron discos de hojas de plantas de tabaco de la

variedad Petit Havana SR 1, cultivadas *in vitro*. Se empleó Kanamicina (100 mg/L) como marcador de selección del evento de transformación.

Para comprobar la presencia de los genes de interés introducidos en el genoma de la planta de tabaco y la expresión de estos, así como la formación de envolturas virales o pentámeros se realizaron diferentes procedimientos, tales como, Southern blot, Western blot, ELISA e Inmunomicroscopía.

**Ejemplo 7. Obtención de envolturas y pentámeros del VHA en plantas transgénicas de Zanahoria (*Daucus carota* L.)**

Para la transformación de esta planta se utilizaron cepas At 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con los plásmidos binarios (pBΔVHARE, pBVHARE, pBΔMLAm, pBMLAm). Hipocótilos de la variedad New Kuroda, de tres semanas de germinados, se cortaron en segmentos de 1 cm y se plantaron en un medio BAN-9 (Murashige Skoog, 1962 (MS), suplementado con NAA a 0,5 mg/L) durante tres días. A continuación se incubaron durante 30 minutos con una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo cada uno de las construcciones anteriormente descritas, y nuevamente se pasaron los explantes al medio BAN-9 durante 72 horas. Pasado este tiempo se sembraron en un medio de regeneración suplementado con kanamicina 100 mg/L. Los brotes aparecieron a partir de las 3 semanas y fueron individualizados y plantados en un medio MS, suplementado igualmente con kanamicina a 100 mg/L. La integración de los genes se pudo comprobar mediante un Southern blot de RCP (Figura 6). La expresión de la poliproteína y su procesamiento y formación de envolturas virales y pentámeros, se demostró mediante el ELISA que se muestra en la Figura 8 y el Western blot de la Figura 7.

**Ejemplo 8. Obtención de envolturas y pentámeros del VHA en plantas transgénicas de Arroz (*Oryza sativa* L.).**

La transformación genética de plantas de arroz se llevó a cabo siguiendo el método empleado por Hiei y colaboradores (1994). Para ello se transformó la cepa At 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* por el método del nitrógeno líquido con los plásmidos binarios desarrollados (pBΔVHARE, pBVHARE, pBΔMLAm, pBMLAm) y con estos recombinantes se transformaron callos obtenidos a partir del escutelo. Se empleó Kanamicina (100 mg/L) como marcador de selección del evento de transformación. Para comprobar la presencia de los genes de interés introducidos en el genoma de la planta de tabaco y la expresión de estos, así como la formación de envolturas

virales o pentámeros se realizaron diferentes procedimientos, los cuales se describen a continuación.

**Ejemplo 9. Caracterización molecular e inmunoquímica de las plantas transgénicas. Análisis por Southern blot.**

- 5 Para obtener el ADN total, con vista a realizar los análisis de Southern blot en las plantas de tabaco, zanahoria y arroz, se utilizó un método rutinario descrito por Dellaporta y colaboradores (1983). Para el análisis de las muestras se tomaron hojas de plantas transformadas con las construcciones señaladas anteriormente y que mostraban resistencia al marcador de selección. Como controles negativos se  
10 utilizaron hojas de plantas no transformadas.

- Las digestiones de los ADN purificados, la electroforesis en gel de agarosa, la transferencia del ADN a una membrana Hybond N y la hibridación, se realizaron según está descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Un fragmento de ADN de 1,2 kb que incluye el gen que codifica para la proteína VP1 fue marcado con <sup>32</sup>P  
15 mediante un Primer-a-Gene Labeling System (Promega Corp., EE.UU.) y usado como sonda radiactiva y como control positivo.

- En la Figura 5 se muestra el Southern de plantas transgénicas de tabaco transformadas con las construcciones para la expresión en el citosol de envolturas y pentámeros del VHA (pBΔMLAm, pBMLAm), digeridas *Sma*I y *Cla*I (resultando una  
20 banda de 3,4 kb) y en el retículo endoplasmático (pBΔVHARE, pBVHARE), digeridas con las enzimas *Sma*I – *Eco*RI (resultando una banda de 2,4 kb). Los resultados que se muestran en la Figura 5 demuestran que las plantas contienen en su genoma la secuencia que codifican para la proteínas estructurales.

- En el caso de las plantas de zanahoria y arroz, se les realizó un Southern al producto de la amplificación mediante la RCP (oligos correspondientes a las  
25 secuencias SEQ ID NO 4 y 5). Como se muestra en la Figura 6, se demostró que la secuencia que codifica para la proteína VP1 marcada radiactivamente se complementa con una banda de 2,5 kb, correspondiente a la talla de la secuencia que codifica para las proteínas estructurales.

- 30 **Análisis por Western blot.**

Los resultados del Western blot se muestran en la Figura 7. La inmunodetección de las moléculas recombinantes obtenidas en el ensayo de expresión se realizó mediante Western blot, según la metodología descrita por Towbin y colaboradores

(1979). Las muestras para el Western blot consistieron en proteínas totales solubles extraídas de diferentes plantas transgénicas de tabaco, zanahoria y arroz, transformadas con las construcciones que posibilitan la expresión de pentámeros exclusivamente: Los clones, tabaco 5, zanahoria 7 y Arroz 3 transformados con la construcción pBAVHARE, que posibilita la expresión de los pentámeros en el retículo endoplasmático de estas plantas; y los clones, tabaco 25, zanahoria 10 transformados con la construcción pBΔMLAm, la cual permite la expresión de los pentámeros en el citosol. Como control negativo se usaron hojas de tabaco de plantas no transformadas y como control positivo la proteína VP1 expresada en *E.coli*. Las hojas se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino y se les adicionó 1 mL de tampón de extracción de proteínas [Tris-HCl 61 mM pH 6,8, Triton 0,1%, glicerol 12,5% y Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM] por gramo de hoja, tal como reporta Schouten y colaboradores (1997). El material insoluble se eliminó por centrifugación a 13 000 rpm.

Las proteínas provenientes de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y las proteínas de interés se identificaron utilizando el AcP anti-VP1 conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (PhoA). La expresión de dicha enzima se detectó mediante una reacción colorimétrica.

Los resultados del Western blot se muestran en la Figura 7 y se puede observar la expresión de una proteína de la talla de la proteína VP1 en todos los cultivos, así como otros intermediarios producto del procesamiento incompleto de la poliproteína.

#### **Ensayo inmunoenzimático (ELISA).**

Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 8. Se realizaron ensayos tipo "Sandwich". Las placas de inmunoensayo (Maxisorp, Nunc) se recubrieron con 10 µg/mL del AcM 7E7, en tampón carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,015 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,028 M, pH 9,6), por 4 horas a 37 °C. Se bloquearon durante 2 horas a 37 °C, con leche descremada al 5% en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) ( $\text{NaCl}$  100 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  80 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, pH 7,4). Posteriormente se adicionaron 100 µL de las muestras correspondientes a plantas transformadas y no transformadas de tabaco, zanahoria y arroz (preparadas de la misma forma que se describe para el Western blot), se dejaron toda la noche a 4 °C. Se lavó y se adicionaron 100 µL del AcM 7E7 conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/1000 (1 µg/mL) en PBS que

contenía leche descremada al 0,5%. La incubación fue a 37 °C por espacio de una hora. La reacción se reveló por adición del sustrato de la enzima 4-nitrofenilfosfato, preparado al 0,1% en Dietanolamina. Se siguió la aparición de color durante 60 minutos. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405nm en un espectrofotómetro SUMA. Los lavados de la placa en cada etapa del ELISA se realizo tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%.

#### **Análisis por inmunomicroscopía electrónica.**

Los resultados de la inmunomicroscopía se muestran en la Figura 9. Las muestras de tejido de hojas de plantas de tabaco transformada con el plásmido pBMLAm y plantas sin transformar provenientes de cultivo de tejido, se fijaron en una solución de Formaldehído al 4% y posteriormente de Glutaraldehido al 0,2%. Se deshidrataron entonces en etanol y embebieron en una solución de Lowicryl K 4M (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg). Los cortes ultra finos se colocaron en una rejilla de níquel y se incubaron con el AcM 7E7, seguido este paso por la incubación con el AcP anti-IgG de ratón, marcado con partículas de oro coloidal de 15 nm (British Bio-Cell International). Las secciones inmunomarcadas se contrastaron por 5 minutos en Uranilacetato y por 7 minutos en Citrato de Plomo, antes de ser examinadas al microscopio electrónico de transmisión (Jeol-Jem 2000EX, Japón). Los resultados muestran partículas de aproximadamente 27 nm de diámetros solo en la planta de tabaco transformada con la construcción pBMLAm, mediante la cual se expresa la proteína en el citosol de la célula.

#### **Ejemplo 10. Purificación de envolturas y pentámeros a partir de plantas transgénicas de tabaco y Arroz.**

Para la purificación de las envolturas y pentámeros se utilizó un anticuerpo monoclonal anti VHA obtenido en los laboratorios del CIGB, que reconoce exclusivamente las partículas y pentámeros inmunogénicos.

Las proteínas de la célula vegetal fueron extraídas utilizando el protocolo descrito para los análisis por Western blot. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue disuelto en cloruro de sodio de 0.5 M y mezclado con el anticuerpo acoplado a un gel (Bio-rad Laboratorios, Richmond, CA) y se incubó por 16 horas a 4 °C. El gel se lavó con 10 volúmenes de PBS (NaCl 100 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,4) y seguidamente se eluyó la proteína de interés con 0,2 M de glicina , pH 2,5. Se neutralizó el eluato con Tris básico y se dializó contra PBS. La presencia de partículas de VHA y pentámeros a partir de estos extractos de hojas fueron

revelados mediante ELISA, utilizando un monoclonal neutralizante comercial 7E7 (Mediagnost), específico para el reconocimiento de envolturas virales y pentámeros del VHA.

**Ejemplo 11. Determinación de la inmunogenicidad de las envolturas y los pentámeros purificados a partir de plantas transgénicas mediante la administración intraperitoneal.**

A los ratones blancos ICR de 14 semanas se les suministraron dos dosis de 750 EL.U con envolturas y pentámeros purificados a partir de plantas transgénicas de tabaco y arroz. De la misma forma se inocularon ratones con un antígeno comercial del VHA (Mediagnost), utilizados como control positivo y con PBS (control negativo). Las muestras de sangre se recolectaron los días 0, 15, 30, 50 y 70 post-inoculación.

Los niveles de anticuerpos producidos se midieron mediante un ELISA de inhibición: se recubrió la placa con 5 µg de AcM 7E7 y se incubó la misma durante 4 horas, seguidamente se lavó una vez con PBS-Tween 0,1%. Se bloqueó añadiendo leche descremada al 5%, diluida en PBS Tween 0,1% y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Se lavó la placa 3 veces con PBS- Tween al 0,1%. A continuación se añadieron los sueros de los ratones inmunizados, previamente incubados por 20 min a 37 °C, con antígeno del VHA (Mediagnost). La placa se incubó durante 12 horas a 16 °C y posteriormente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.1%. Finalmente se adicionaron 100 µL del AcM 7E7 conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/1000 en PBS que contenía leche descremada al 0,5%. La incubación fue a 37 °C durante una hora. La reacción se reveló mediante la adición del sustrato de la enzima 4-nitrofenilfosfato, preparado al 0,1% en dietanolamina. Se siguió la aparición de color durante 60 minutos. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro (SUMA). En la Figura 10 se muestran los niveles promedio de inhibición de los sueros de los ratones inoculados con el antígeno purificado a partir de plantas transgénicas, detectados en sangre de los ratones inmunizados con pentámeros producidos por las plantas de tabaco y arroz. De igual forma se observaron niveles semejantes de anticuerpo en los ratones inmunizados con el antígeno producido de plantas de tabaco y arroz que se transformaron con las construcciones que permiten la expresión de envolturas y pentámeros.

**Ejemplo 12. Determinación de la inmunogenicidad de las envolturas y pentámeros purificados a partir de plantas transgénicas mediante la administración oral .**

La administración oral del antígeno se realizó por dos vías: utilizando el antígeno  
5 purificado y suministrándole a los animales zanahorias que expresan el antígeno.

Para la determinación de la antigenicidad mediante la administración oral del  
envolturas y pentámeros purificados, se les administraron a ratones Balb/c de 8  
semanas, pentámeros y envolturas virales durante 8 semanas, en cuatro dosis de  
7500 EL.U. Se colectaron 200 µl de sangre a los 0, 15, 30, 50 y 70 días post-  
10 inoculación para detectar la presencias de anticuerpos anti VHA, mediante un  
ELISA de inhibición.

El ELISA de inhibición se realizó mediante el procedimiento descrito anteriormente  
en el ejemplo 11.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 11, la administración oral de  
15 pentámeros del VHA expresados en plantas transgénicas produce respuesta  
inmunológica lo que se demuestra por los promedios de inhibición de los sueros de  
los ratones utilizados en el experimento. Los promedios de inhibición de los sueros  
administrados oralmente son menores al ser comparados con los obtenidos  
después de la administración intraperitoneal. La administración oral de pentámeros  
20 mediante el uso de plantas comestibles, se realizó alimentando a los ratones con 5  
g de zanahoria crudas (transformadas con la construcción pBΔMLAm que está  
diseñada para que se produzcan solamente pentámeros) una vez a la semana  
durante cuatros semanas. Como control negativo se utilizaron los sueros de ratones  
alimentados con zanahorias no transformadas. La capacidad de estas plantas de  
25 provocar una respuesta de anticuerpos se demostró mediante un ELISA de  
inhibición mostrado en la Figura 12.

## LISTA DE SECUENCIAS

JC20 Rec'd PCT/PTO 23 JUN 2005

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- 5 <120> ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A  
OBTENIDOS EN PLANTAS TRANSGENICAS.
- <130> MLA
- 10 <140>  
<141>
- <160> 24
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1  
<211> 25  
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<221> primer\_bind  
25 <222> (1)..(25)  
<223> Secuencia # 1.  
Secuencia del oligonucleotido # 1, utilizado para  
amplificar la secuencia MLA mediante RT-PCR.
- 30 <400> 1  
cttaatctag aatgaatatg tccaa 25
- <210> 2  
35 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
40 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(22)  
<223> Secuencia # 2.  
Secuencia del oligonucleotido #2, utilizado para  
amplificar la secuencia MLA mediante RT-PCR.
- 45 <400> 2  
gaaagaaata aagggtacctc ag 22
- 50 <210> 3  
<211> 6685  
<212> ADN  
<213> Hepatitis A virus
- 55 <220>  
<221> gene  
<222> Complement((1)..(6685))  
<223> Secuencia # 3.  
Secuencia nucleotídica que codifica para el Marco  
60 de Lectura Abierto (MLA) del VHA de la cepa cubana  
M2.

<400> 3

	atgaatatgt	ccaaacaagg	aatthttccag	actggttgga	gtggccttga	ccacatcctg	60
	tccttggcag	atattgagga	agagcaaagt	attcagtcog	ttgataggac	tgcagtgcact	120
	ggagcttctt	atthtcacttc	tgtggaccac	tcttcagttc	atactgctga	ggttgggtca	180
5	caccaaattg	aacctttgaa	aacctctgtt	gataaacctg	gttctaagaa	aactcagggg	240
	gagaagtttt	tcttgattca	ttctgctgat	tggtcacta	cacatgctct	ctttcatgaa	300
	gttgcaaaat	tgatgtgggt	gaaactgctg	tacaatgagc	agtttgccgt	ccaaggtttg	360
	ttgagatacc	atacttatgc	aagatttggc	attgagattc	aagttcagat	aaatcccaca	420
	ccctttcagc	aaggaggact	aatctgtgcc	atggttccctg	gtgaccaaag	ttatgggtta	480
10	atagcatcct	tgactgttta	tcctcatggt	ctgttaaatt	gcaatatcaa	caatgtagtt	540
	agaataaagg	ttccattttat	ttatactaga	ggtgcttatc	atthttaaaga	tccacagttac	600
	ccagttttggg	aattgacaat	cagagtttgg	tcagagttga	atattggaaac	aggaacctca	660
	gcttataactt	cactcaatgt	tttagctagg	tttacagatt	tgaggttgca	tggtattaact	720
	cctcttttcta	cacagatgat	gagaaatgaa	tttagagtta	gtactactga	aaatgttgta	780
15	aatttgtcaa	attatgaaga	tgcaagggca	aaaatgtcct	ttgctttgga	tcaggaagat	840
	tggaagtctg	atccttccca	aggtgggtgga	attaaaatta	ctcatttcac	tacctggaca	900
	tccattccaa	ccttagctgc	tcagtttcca	ttcaatgctt	cagattcagt	tgggcaacaa	960
	attaaagtta	taccagtggg	cccatacttt	ttccagatga	caaacactaa	tcctgatcaa	1020
	aaatgtataa	cagccttggc	ctctatttgt	cagatgttct	gcttttgagg	gggagatctt	1080
20	gttttctgatt	tccaggtttt	tccaacccaa	tatcattcag	gtaggctgtt	gttttgtttt	1140
	gttcctggga	atgagttaat	agatgttact	ggaattacat	taaaacaggc	aactactgct	1200
	ccttgtgcag	tgatggacat	tacaggagtg	cagtcaacct	tgagatttcg	tgttccttgg	1260
	atthctgata	cacctatcg	agtgaatagg	tacacgaagt	cagcacatca	aaaaggtgag	1320
	tatactgcc	ttgggaagct	tattgtgtat	tgttataata	gattgacttc	tccttctaata	1380
25	gttgcttctc	atgttagagt	taatgtttat	ctttcagcaa	ttaatthtga	atgttttgct	1440
	cctcttttacc	atgctatgga	tgttaccaca	caggttgagg	atgattcagg	aggtthtctca	1500
	acaacagttt	ctacagagca	gaatgttctt	gatccccaag	ttggcataac	aacctagagg	1560
	gatttaaaag	ggaaagccaa	taggggaaag	atggatgtat	caggagtgc	ggtacctgtg	1620
	ggagctatta	caacaattga	ggatccagtt	ttagcaaaga	aagtacctga	gacatttctt	1680
30	gaattgaagc	ctggagaatc	cagacataca	tcagatcaca	tgtctattta	taaattcatg	1740
	ggaaggtctc	atthcttctg	tactthttact	tttaattcaa	acaataaaga	gtacacattt	1800
	ccaataactc	tgtcttgcag	ttctaatact	cctcatggtt	taccatcaac	attaaggtgg	1860
	ttctthtaatt	tgthttcagtt	gtatagagga	ccattggatt	tgacaattat	aatcacagga	1920
	gccactgatt	ggcctgggtt	actccagttg	gccttgctgt	cgacacctct	agctgttaga	1980
35	tggttgga	agaagtcagc	tttgtctatt	gattataaaa	ctgcccttgg	agctgttaga	2040
	tttaatacaa	gaagaacagg	gaacattcag	attagattgc	catggatttc	ttatttgtat	2100
	gccgtgtctg	gagcactgga	tggtctggga	gataagacag	attctacatt	tggtattggt	2160
	tctattcaga	ttgcaaat	caatcattct	gatgaatatt	tgctcctttg	ttgttatttg	2220
	tctgtcacag	agcaatcaga	gttctatttc	cctagagctc	cattaaattc	aaatgctatg	2280
40	ttgtccactg	agtcctatgat	gagtagaatt	gcagctggag	acttgagtc	atcagtggtat	2340
	gatccagctg	cagaggagga	cagaagattt	gagagtcata	tagaatgtag	gaaacctat	2400
	aaagaattga	gactggagggt	tggaacaa	agaatcaaat	atgctcagga	agagttatca	2460
	aatgaagtgc	ttccacctcc	taggaaaatg	aaggggttat	tttcacaagc	taaaatttct	2520
	ctthttttata	cagaggacca	tgaaataatg	aaatthttct	ggagaggagt	gactgctaata	2580
45	actagggtct	tgagaagatt	tggtattctc	ctggctgctg	gtagaagtgt	gtggactctt	2640
	gaaatggatg	ctggagttct	tactggaaga	ttgatcagat	tgaatgatga	gaaatggaca	2700
	gaaatgaagg	atgataagat	tgthttcatta	attgaaaagt	tcacaagcaa	taaacattgg	2760
	tctaaagtga	atthttccaca	tggaatgttg	gatcttgagg	aaattgctgc	caactctaaa	2820
	gattthtccaa	atatgtctga	gacagatttg	tgthttctgt	tgcatthggct	aaatccaaag	2880
50	aaaatttaatt	tagcagatag	aatgcttgga	ttgtctggag	tgcaaggaaat	taaagaacag	2940
	ggtgttggac	tgatagcaga	gtgtagaact	ttcttggtat	ctattgctgg	gactthtgaaa	3000
	tctatgattt	ttgggtttca	ttattctgtg	actgttgaaa	ttataaatat	tgthtcttct	3060
	tttattaaga	gtggaatcct	gctthtatgtc	atacaacaat	tgaaccaaga	tgaacactct	3120
	cacataaattg	gtthtttgag	agthtatgaat	tatgcagata	ttggctgttc	agthtcttca	3180
55	tggtggaagg	ttthttccaa	aatgttgaaa	acagthttta	attggcaaat	ggactctaga	3240
	atgatggagc	tgaggactca	gagcttctcc	aattgggtta	gagatatttg	ttcggaattt	3300
	actattthtta	aaagthttta	ggatgccata	tattgggttat	gtacaaaatt	gaaggatttt	3360
	tatgaagtaa	attatggcaa	gaaaaaggat	gttcttaata	ttctcaaaga	taaccagcaa	3420
	aaaatagaaa	aagccattga	agaagcagac	aatthtttga	ttthtgaat	tcaagatgtg	3480
60	gagaaatttg	atcagtatca	gaaaggggtt	gatttaatac	aaaagctgag	aactgtccat	3540
	tcaatggctc	aagthtgacc	cagthttggg	gttctattgt	cactctcag	agattgcata	3600
	gcaagagctc	atcaaaagct	caagaatctt	ggatctataa	atcaggccat	ggttaacaaga	3660

5 tgtgagccag ttgtttgcta tttgtatggc aaaagagggg gagggaaaag cttgacttca 3720  
 attgcattgg caaccaaatt ttgtaaacac tatggtgttg aacctgagaa aaatatttac 3780  
 accaaacctg tggcctcaga ttattgggat ggatatagtg gacaattagt ttgtattatt 3840  
 gatgatatcg gccaaaacac aacagatgaa gattgggtcag atttttgtca attagtgtca 3900  
 10 ggatgcccaa tgagattgaa tatggcttct cttgaggaga agggcagaca tttttcctct 3960  
 ccttttataa tagcatcttc aaattggtca aatccaagtc caaaaacagt ttatgttaaa 4020  
 gaagcaattg atcgtaggct tcattttaag gttgaagtta aacctgcttc attttttaaa 4080  
 aatcctcaca atgatatgtt aaatgttaat ttggctaaaa caaatgatgc aattaaagac 4140  
 atgtcttggt ttgatttgat aatggatgga cacaatattt cattgatgga tttacttagt 4200  
 15 tccttagtga tgacagggtga aattagaaaa cagaatatga gtgaattcat ggagttgttg 4260  
 tctcaggga tttcagatga tgacaatgat agtgcagtag ctgagttttt ccggtctttt 4320  
 ccattcgggt aacctcaaa ttccaagtta tctagttttt tccaagctgt cactaatcac 4380  
 aagtgggttg ctttgggagc tgcagttggt attcctggat tgctagtggg aggatggttt 4440  
 gtgtataagc atttttcccg caaagaggaa gaaccaattc cagctgaagg ggtttatcat 4500  
 20 ggagtgaact agcccaaaca agtgattaaa ttggatgcag atccagtaga gtctcagtc 4560  
 actctagaaa tagcaggatt agttaggaaa aatttggttc agtttgaggt tggtgagaaa 4620  
 aatggatgtg tgagatgggt catgaatgcc ttaggagtga aggatgattg gttgttagta 4680  
 ccttctcatg cttataaatt tgaaaaggat tatgaaatga tggagtttta tttcaataga 4740  
 ggtggaactt actattcaat ttcagctggt aatgttgta ttcaatcttt agatgtggga 4800  
 25 ttccaagtta ttgttcta atgttccctt acaattccca agtttagaga tattactcaa 4860  
 cattttatta agaaaggaga tgtgcctaga gccttgaatc gcttggcaac attagtga 4920  
 accgttaatt gaactcctat gttaatttct gagggacctt taaaaatgga agaaaaagcc 4980  
 acttatgttc ataagaagaa tgatggtact acggttgatt tgactgtaga tcaggcatgg 5040  
 agagggaaaag gtgaaggctt tcctggatgt tgtggtgggg ccctagtgtc atcaaatcag 5100  
 30 tccatacaaa atgcaatttt gggtattcat gttgctggag gaaattcaat tcttggtgga 5160  
 aagttgatta ctcaagaaat gtttcaaaac atgataaga aaattgaaag tcagagaata 5220  
 atgaaaagtg aattttactca atgttcaatg aatgtagtct ccaaaaacgct ttttagaaag 5280  
 agtcccatcc atcaccacat tgataaaacc atgattaatt ttctctgcagc tatgcctttc 5340  
 tctaaagctg aaattgatcc aatggctatg atgttgctca aatattcatt acctattgtg 5400  
 35 gaagaaccag aggattacaa agaagcttca gttttttatc aaaataaaat agtaggcaag 5460  
 actcagctag ttgatgactt tctagatctt gatatggcca ttacaggggc tccaggcatt 5520  
 gatgctatta atatggattc atctcctggg tttccttatg ttcaagaaaa attgactaaa 5580  
 agagatttga tttggttgga tgaaaatggg ttactgttag gagttcaccc aagattggcc 5640  
 40 cagagaatct tatttaatac tgtcatgatg gaaaattggt ctgacttaga tgttgttttt 5700  
 acaacttgtc caaaagatga attgagacca ttagagaaaag ttttggaatc aaaaacaaga 5760  
 gctattgatg cttgcccctt ggattataca attttatgtc gaatgtattg gggccagct 5820  
 attagttatt ttcatttgaa tccagggttt cacacagggt ttgctattgg catagatcct 5880  
 gatagacagt gggatgaatt atttaaaaca atgataagat ttggagatgt tggctttgat 5940  
 ttagattttt ctgcttttga tgccagcttt agtccattta tgattaggga agcaggtaga 6000  
 45 atcatgagtg aattatctgg aacaccatct cattttgga cagctcttat caatactatc 6060  
 atttattcta aacatctgct gtacaattgt tgttatcacg tctgtggttc aatgccttct 6120  
 gggctccttt gtacagcttt gttgaattca attattaata atattaattt gtattatgtg 6180  
 ttttctaaaa tatttggaat gtctccagtt tttttttgtc aagctttgag gatcctttgt 6240  
 tatggagatg atgttttgat agttttttcc agagatgttc aaattgataa tcttgacttg 6300  
 50 attggacaga aaattgtgga tgagttcaaa aaacttgcca tgacagccac ttcagctgac 6360  
 aaaaatgtgc ctcaactgaa gccagtttca gaattgactt ttcttaaaag atcttttaat 6420  
 ttggtggagg acagaatcag acctgcaatt tcagaaaaa caatttggtc tttgatagct 6480  
 tggcagagaa gtaacgctga gtttgagcag aatttagaaa atgctcagtg gtttgctttc 6540  
 atgcatggct atgagttcta tcagaaattc tattattttt ttcagtcctg tttggagaaa 6600  
 55 gagatgatag aatatagact taaatcttat gattggtgga gaatgagatt ttatgaccag 6660  
 tgtttcattt gtgacctttc atgat 6685

55 <210> 4  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <221> primer bind  
 <222> (1)..(40)  
 <223> Secuencia # 4.

Secuencia del oligonucleotido #4, utilizado para  
amplificar la secuencia P1-2A mediante PCR.

```

5  <400> 4
   ttgaattcag cttgtgaaaa taacccttc attttcctag      40

   <210> 5
   <211> 28
10  <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <221> primer_bind
15  <222> (1)..(28)
   <223> Secuencia # 5.
       Secuencia del oligonucleotido #5, utilizado para
       amplificar la secuencia P1-2A mediante PCR.

20  <400> 5
   cgccccgggtc tagaatgaat atgtccaa      28

   <210> 6
25  <211> 2523
   <212> ADN
   <213> Hepatitis A virus

   <220>
30  <221> gene
   <222> Complement{(1)..(2523)}
   <223> Secuencia # 6.
       Secuencia nucleotídica codificante para las
       proteínas estructurales (P1-2A) del VHA de la cepa
35  M2

   <400> 6
   atgaatatgt ccaaacaagg aatthttccag actggttggga gtggccttga ccacatcctg 60
   tccttggcag atattgagga agagcaaagt attcagtcag ttgataggac tgcagtgact 120
40  ggagcttctt atttcacttc tgtggaccaa tcttcagttc atactgctga ggttggctca 180
   caccaaattg aacctttgaa aacctctgtt gataaacctg gttctaagaa aactcagggg 240
   gagaagtgtt tcttgattca ttctgctgat tggctcacta cacatgctct ctttcatgaa 300
   gttgcaaaat tggatgtggt gaaactgctg tacaatgagc agtttgccgt ccaaggtttg 360
   ttgagatacc atacttatgc aagatttggc attgagattc aagttcagat aaatcccaca 420
45  ccctttcagc aaggaggact aatctgtgcc atggttcctg gtgaccaaag ttatggttca 480
   atagcatcct tgactgttta tcctcatggt ctgttaaatt gcaatatcaa caatgtagtt 540
   agaataaagg ttccatttat ttatactaga ggtgcttatc attttaaaga tccacagtac 600
   ccagtttggg aattgacaat cagagtttgg tcagagttga atattggaac aggaacctca 660
   gcttatactt cactcaatgt tttagctagg tttacagatt tggagttgca tggattaact 720
50  cctctttcta cacagatgat gagaaatgaa tttagagtta gtactactga aaatgttgta 780
   aatttgtcaa attatgaaga tgcaagggca aaaatgtcct ttgctttgga tcaggaagat 840
   tggaagtctg atccttccca aggtggtgga attaaaatta ctcatthcac tacctggaca 900
   tccattccaa ccttagctgc tcagtttcca ttcaatgctt cagattcagt tgggcaacaa 960
   attaaagtta taccagtgga ccatacttt ttccagatga caaacactaa tcctgatcaa 1020
55  aaatgtataa cagccttggc ctctatttgt cagatgttct gcttttggag gggagatcct 1080
   gttttcgatt tccaggtttt tccaaccaa tatcattcag gtaggctgtt gttttgtttt 1140
   gttcctggga atgagttaat agatgttact ggaattacat taaaacaggc aactactgct 1200
   ccttgtgcag tgatggacat tacaggagtg cagtcaacct tgagatttcg tgttccttgg 1260
   atttctgata caccctatcg agtgaatagg tacacgaagt cagcacatca aaaaggtgag 1320
60  tatactgcc a ttgggaagct tattgtgtat tgttataata gattgacttc tccttctaata 1380
   gttgcttctc atgttagagt taatgtttat ctttcagcaa ttaatttgg aatgttttct 1440
   cctctttacc atgctatgga tgttaccaca caggttggag atgattcagg aggttttctca 1500

```

acaacagttt ctacagagca gaatgttcct gatccccaag ttggcataac aaccatgagg 1560  
 gattttaaag ggaaagccaa taggggaaag atggatgtat caggagtgc ggtacctgtg 1620  
 ggagctatta caacaattga ggatccagtt ttagcaaaga aagtacctga gacatttcct 1680  
 5 gaattgaagc ctggagaatc cagacatata tcagatcaca tgtctattta taaattcatg 1740  
 ggaaggctct atttctgtg tacttttact tttaattcaa acaataaaga gtacacattt 1800  
 ccaataactc tgtcttcgac ttctaatacct cctcatgggt taccatcaac attaagggtg 1860  
 ttctttaatt tgtttcagtt gtatagagga ccattggatt tgacaattat aatcacagga 1920  
 gccactgatg tggatgggtat ggcctgggtt actccagtgg gccttgctgt cgacaccctt 1980  
 tgggtggaaa agaagtcagc tttgtctatt gattataaaa ctgcccttgg agctgttaga 2040  
 10 tttaatacaa gaagaacagg gaacattcag attagattgc catggtattc ttatttgtat 2100  
 gccgtgtctg gagcactgga tggcttgga gataagacag attctacatt tggattgggt 2160  
 tctattcaga ttgcaaatta caatcattct gatgaatatt tgccttttag ttgttatttg 2220  
 tctgtcacag agcaatcaga gttctatttc cctagagctc cattaaattc aaatgctatg 2280  
 ttgtccactg agtccatgat gagtagaatt gcagctggag acttgagtc atcagtggat 2340  
 15 gatccagat cagaggagga cagaagattt gagagtcata tagaatgtag gaaaccatat 2400  
 aaagaattga gactggaggt tgggaaacaa agaatcaat atgctcagga agagtatatca 2460  
 aatgaagtgc ttccacctcc taggaaaatg aaggggttat atgcttctgg aggtgaattc 2520  
 gat 2523

20 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> (1)..(27)  
 <223> Secuencia # 7.  
 30 Secuencia del oligonucleotido # 7, utilizado para  
 amplificar la secuencia 3A mediante PCR.

<400> 7  
 35 ccatgggaat ttcagatgat gacaatg 27

<210> 8  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> (1)..(26)  
 45 <223> Secuencia # 8.  
 Secuencia del oligonucleotido # 8, utilizado para  
 amplificar la secuencia 3A mediante PCR.

<400> 8  
 50 ggatatcggg tcttcctctt tgcggg 26

<210> 9  
 <211> 85  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 60 <221> gene  
 <222> (1)..(85)  
 <223> Secuencia # 9.

Fragmento sintético cuya secuencia nucleotídica  
codifica para la proteína 3B y donde se sustituyen  
los nucleótidos T por C y G por C respectivamente

- 5 <400> 9  
tccagctgtt ggggtttatc atggagtgac taagcccaaa caagtgatta aattggatgc 60  
agatccagta gagtctcagt tgact 85
- 10 <210> 10  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>  
<221> gene  
<222> (1)..(89)  
<223> Secuencia # 10.
- 20 Fragmento sintético cuya secuencia nucleotídica  
codifica para la proteína 3B y donde se sustituyen  
los nucleótidos T por C y G por C respectivamente  
(cadena complementaria).
- 25 <400> 10  
ctagagtcaa ctgagactct actggatctg catccaattt aatcacttgt ttgggcttag 60  
tcactccatg ataaacccca acagctgga 89
- 30 <210> 11  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(25)  
<223> Secuencia # 11.
- 40 Secuencia del oligonucleótido # 11, utilizado  
para amplificar la secuencia 3C mediante PCR.
- <400> 11  
tctcagtcaa ctctagaaat agcag 25
- 45 <210> 12  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(21)  
<223> Secuencia # 12.
- 55 Secuencia del oligonucleótido # 12, utilizado  
para amplificar la secuencia 3C mediante PCR.
- <400> 12  
ataagcttga tcaattttct t 21
- 60 <210> 13

<211> 978  
 <212> ADN  
 <213> Hepatitis A virus

5 <220>  
 <221> gene  
 <222> Complement((1)..(978))  
 <223> Secuencia # 13.  
 10 Secuencia correspondiente a la región de la  
 poliproteína 3ABC con actividad proteolítica y  
 donde los sitios de autoprosesamiento se  
 encuentran mutados.

<400> 13  
 15 gaattcctgc agcccggggg atccatggga atttcagatg atgacaatga tagtgacgta 60  
 gctgagtttt tccggtcttt tccatctggt gaaccatcaa attccaagtt atctagtttt 120  
 ttccaagctg tcaactaatca caagtgggtt gctgtgggag ctgcagttgg tattcttgga 180  
 ttgctagtgg gaggatgggt tgtgtataag catttttccc gcaaagagga agaaccaatt 240  
 ccagctgttg ggggttatca tggagtgact aagcccaaac aagtgattaa attggatgca 300  
 20 gatccagtag agtctcagtt gactctagaa atagcaggat tagttaggaa aaatttggtt 360  
 cagtttgagg ttggtgagaa aaatggatgt gtgagatggg tcatgaatgc cttaggagtg 420  
 aaggatgatt ggttgtagt accttctcat gcttataaat ttgaaaagga ttatgaaatg 480  
 atggagtttt atttcaatag aggtggaact tactattcaa ttccagctgg taatgttgtt 540  
 attcaatcct tagatgtggg attccaagat gttgttctaa tgaaggttcc tacaattccc 600  
 25 aagtttagag atattactca acattttatt aagaaaggag atgtgcctag agccttgaat 660  
 cgcttggaac cattagtgc aacogttaat ggaactccta tgtaatttc tgaggacact 720  
 ttaaaaaatg aagaaaaagc cacttatgtt cataagaaga atgatggtac tacgggtgat 780  
 ttgactgtag atcaggcatg gagaggaaaa ggtgaaggtc ttcttggaat gtgtgggtggg 840  
 gcctagtgt catcaaatca gtccatacaa aatgcaattt tgggtattca tgttgctgga 900  
 30 ggaaattcaa ttcttgtggc aaagttgatt actcaagaaa tgtttcaaaa cattgataag 960  
 aaaattgaaa tcaagctt 978

<210> 14  
 35 <211> 3489  
 <212> ADN  
 <213> Hepatitis A virus

<220>  
 40 <221> gene  
 <222> Complement((1)..(3489))  
 <223> Secuencia # 14.  
 Secuencia nucleotídica que codifica para el nuevo  
 Marco de Lectura Abierto modificado (MLAM) de la  
 45 cepa cubana M2 del VHA,

<400> 14  
 atgaatatgt ccaaacaagg aattttccag actgttggga gtggccttga ccacatcctg 60  
 tccttggcag atattgagga agagcaaagt attcagtcctg ttgataggac tgcagtgact 120  
 50 ggagcttctt atttcacttc tgtggaccaa tcttcagttc atactgctga ggttggctca 180  
 caccaaattg aacctttgaa aacctctgtt gataaacctg gttctaagaa aactcagggg 240  
 gagaagtttt tcttgattca ttctgctgat tggctcacta cacatgctct ctttcatgaa 300  
 gttgcaaaat tggatgtggt gaaactgctg tacaatgagc agtttgccgt ccaagggttg 360  
 ttgagatacc atacttatgc aagatttggc attgagattc aagttcagat aaatcccaca 420  
 55 ccttttcagc aaggaggact aatctgtgac atggttcctg gtgaccaaag ttatggttca 480  
 atagcatcct tgactgttta tcctcatggt ctgttaaatt gcaatatcaa caatgtagt 540  
 agaataaagg ttccatttat ttatactaga ggtgcttatc attttaaaga tccacagtac 600  
 ccagtttggg aattgacaat cagagtttgg tcagagttga atattggaac aggaacctca 660  
 gcttataact cactcaatgt tttagctagg tttacagatt tggagttgca tggattaact 720  
 60 cctcttttca cacagatgat gagaaatgaa tttagagtta gtactactga aaatggttga 780  
 aatttgtcaa attatgaaga tgcaagggca aaaatgtctt ttgctttgga tcaggagat 840  
 tggaagtctg atccttccca aggtggtgga attaaatta ctcatctcac tacctggaca 900

```

tccattccaa ccttagctgc tcagtttcca ttcaatgctt cagattcagt tgggcaacaa 960
attaaagtta taccagtggg cccatacttt ttccagatga caaacactaa tccatgatcaa 1020
aaatgtataa cagccttggc ctctatattgt cagatgttct gcttttggag gggagatcct 1080
gttttctgatt tccaggtttt tccaacccaa tatcattcag gtaggctgtt gttttgtttt 1140
5 gttcctggga atgagttaat agatgttact ggaattacat taaaacaggc aactactgtc 1200
ccttggtcag tgatggacat tacaggagtg cagtcaacct tgagatttcg tgttccttgg 1260
atttctgata caccctatcg agtgaatagg tacacgaagt cagcacatca aaaaggtgag 1320
tatactgccg ttgggaagct tattgtgtat tgttataata gattgacttc tcccttcta 1380
gttgcttctc atgttagagt taatgtttat ctttcagcaa ttaatttggg atgttttgc 1440
10 cctctttacc atgctatgga tgttaccaca caggttggag atgattcagg aggtttctca 1500
acaacagttt ctacagagca gaatgttcct gatccccaag ttggcataac aaccatgagg 1560
gatttaaaag ggaagccaa taggggaaag atggatgtat caggagtgcg ggtacctgtg 1620
ggagctatta caacaattga ggatccagt ttagcaaga aagtaacctga gacatttcct 1680
gaattgaagc ctggagaatc cagacataca tcagatcaca tgtctattta taaattcatg 1740
15 ggaaggtctc atttcttctg tacttttact tttaattcaa acaataaaga gtacacattt 1800
ccaataatc tgtcttcgac ttctaactct cctcatggtt taccatcaac attaggtgg 1860
ttctttaatt tgtttcagtt gtatagagga ccattggatt tgacaattat aatcacagga 1920
gccactgatg tggatggtat ggcttgggtt actccagtgg gccttgctgt cgacaccct 1980
tgggtggaaa agaagtcagc tttgtctatt gattataaaa ctgcccttgg agctgttaga 2040
20 ttttaataca gaagaacagg gaacattcag attagattgc catggatttc ttatttggat 2100
gccgtgtctg gagcactgga tggcttggga gataagacag attctacatt tggattggtt 2160
tctattcaga ttgcaaatta caatcattct gatgaatatt tgtcctttag ttgttatttg 2220
tctgtcacag agcaatcaga gttctatttc cctagagctc cattaaattc aaatgctatg 2280
ttgtccactg agtccatgat gagtagaatt gcagctggag acttgagtc atcagtggat 2340
25 gatcccgat cagaggagga cagaagattt gagagtcata tagaatgtag gaaaccatat 2400
aaagaattga gactggaggt tgggaaacaa agaatcaaat atgctcagga agagttatca 2460
aatgaagtgc ttccacctcc taggaaaatg aaggggttat tttcacaagc tgaattcctg 2520
cagcccggtg gatccatggg aatttcagat gatgacaatg atagtgcagt agctgagttt 2580
ttccggtctt ttccatctgg tgaaccatca aattccaagt tatctagttt tttccaagct 2640
30 gtcactaatc acaagtgggt tgcgtggtga gctgcagttg gtattcttgg attgctagtg 2700
ggaggatggt ttgtgtataa gcatttttcc cgcaaagagg aagaaccaat tccagctgtt 2760
ggggtttatc atggagtgc taagcccaaa caagtgatta aattggatgc agatccagta 2820
gagtctcagt tgactctaga aatagcagga ttagttagga aaaatttggg tcagtttggg 2880
gttggtgaga aaaatggatg tgtgagatgg gtcattgaatg ccttaggagt gaagatgat 2940
35 tgggtgttag taccttctca tgcattataaa tttgaaaagg attatgaaat gatggagttt 3000
tatttcaata gaggtggaac ttactattca atttcagctg gtaatgttgt tattcaatct 3060
ttagatgtgg gattccaaga tgttgttcta atgaaggttc ctacaattcc caagttttaga 3120
gatattactc aacattttat taagaaagga gatgtgccta gagccttgaa tcgcttgga 3180
acattagtga caaccgttaa tggaactcct atgttaattt ctgagggacc tttaaaaatg 3240
40 gaagaaaaag ccacttatgt tcataagaag aatgatggtg ctacggttga tttgactgta 3300
gatcaggcat ggagggaaa aggtgaaggt cttcctggaa tgtgtggtgg ggccctagtg 3360
tcatcaaatc agtccatata aaatgcaatt ttgggtattc atgttgctgg aggaaattca 3420
attcttgtgg caaagttgat tactcaagaa atgtttcaaa acattgataa gaaaattgaa 3480
45 atcaagctt 3489

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; ADN

50 &lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (1)..(51)

55 &lt;223&gt; Secuencia # 15.

Fragmento sintético que restituye el inicio de la transcripción de la proteína VP2.

&lt;400&gt; 15

60 gggatggata ttgaggaaga gcaaatgatt cagtccgttg ataggactgc a

51

<210> 16  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(47)  
 <223> Secuencia # 16.  
 10 Fragmento sintético que restituye el inicio de la  
 transcripción de la proteína VP2 (cadena  
 complementaria).  
 <400> 16  
 15 gtcctatcaa cggactgaat catttgctct tcctcaatat ccatccc 47  
 <210> 17  
 <211> 3426  
 20 <212> ADN  
 <213> Hepatitis A virus  
 <220>  
 <221> gene  
 25 <222> Complement((1)..(3426))  
 <223> Secuencia # 17.  
 Secuencia que codifica para el nuevo Marco de  
 Lectura Abierto modificado (DMLAM) de la cepa  
 cubana M2 del VHA. Esta secuencia no tiene el gen  
 30 que codifica para la proteína VP4.  
 <400> 17  
 gggatggata ttgaggaaga gcaaatgatt cagtcggtg ataggactgc agtgactgga 60  
 gcttcttatt tcacttctgt ggaccaatct tcagttcata ctgctgaggt tggctcacac 120  
 35 caaattgaac ctttgaaaac ctctgttgat aaacctggtt ctaagaaaac tcagggggag 180  
 aagtttttct tgattcattc tgctgattgg ctactacac atgctctctt tcatgaagtt 240  
 gcaaaattgg atgtggtgaa actgctgtac aatgagcagt ttgccgtcca aggtttgttg 300  
 agataccata cttatgcaag atttggcatt gagattcaag ttcagataaa tcccacaccc 360  
 tttcagcaa gaggactaat ctgtgccatg gttcctggtg accaaagtta tggttcaata 420  
 40 gcatccttga ctgtttatcc tcatggtctg tttaaattgca atatcaacaa tgtagttaga 480  
 ataaaggttc catttattta tactagaggt gcttatcatt ttaaagatcc acagtaccca 540  
 gtttggaat tgacaatcag agtttggtca gagttgaata ttggaacagg aacctcagct 600  
 tatacttcac tcaatgtttt agctaggttt acagatttgg agttgcatgg attaaactcct 660  
 ctttctacac agatgatgag aaatgaattt agagtttagta ctactgaaaa tgttgtaaat 720  
 45 ttgtcaaatt atgaagatgc aagggcaaaa atgtcttttg ctttgatca ggaagattgg 780  
 aagtcctgac cttcccaagg tgggtggaatt aaaattactc atttcactac ctggacatcc 840  
 attccaacct tagctgctca gtttccattc aatgcttcag attcagttgg gcaacaaatt 900  
 aaagttatac cagtggaacc atacttttcc cagatgacaa aactaatcc tgatcaaaaa 960  
 tgtataacag ccttggcctc tatttgtcag atgttctgct tttggagggg agatcttgtt 1020  
 50 ttcgatttcc aggtttttcc aaccaaatat cattcaggta ggctgttgtt ttgttttgtt 1080  
 cctgggaatg agttaataga tgttactgga attacattaa aacaggcaac tactgctcct 1140  
 tgtgcagtga tggacattac aggagtgcag tcaaccttga gatttcgtgt tccttggatt 1200  
 tctgatacac cctatcgagt gaataggtac acgaagtcag cacatcaaaa aggtgagat 1260  
 actgccattg ggaagcttat tgtgtattgt tataatagat tgacttctcc ttctaattgt 1320  
 55 gcttctcatg tttagagttaa tgtttatctt tcagcaatta atttggaatg ttttgtcct 1380  
 ctttaccatg ctatggatgt taccacacag gttggagatg attcaggagg tttctcaaca 1440  
 acagtttcta cagagcagaa tgttctgat cccaagtgtg gcataacaac catgagggat 1500  
 ttaaaaggga aagccaatag gggaaagatg gatgtatcag gagtgcaggt acctgtggga 1560  
 gctattacaa caattgagga tccagtttta gcaagaaa tacctgagac atttcctgaa 1620  
 60 ttgaagcctg gagaatccag acatacatgt gatcacatgt ctatttataa attcatggga 1680  
 aggtctcatt tcttgtgtac ttttactttt aattcaacaa ataaagagta cacatttcca 1740  
 ataactctgt cttcgacttc taatcctcct catggtttac catcaacatt aaggtgggtc 1800

ttttaatttgt ttcagttgta tagaggacca ttggatttga caattataat cacaggagcc 1860  
 actgatgtgg atggtatggc ctggtttact ccagtgggcc ttgctgtcga cacccttgg 1920  
 gtggaaaaga agtcagcttt gtctattgat tataaaactg cccttggagc tgtagattt 1980  
 5 aatacaagaa gaacagggaa cattcagatt agattgccat ggtattctta tttgtatgcc 2040  
 gtgtctggag cactggatgg cttgggagat aagacagatt ctacatttgg attggtttct 2100  
 attcagattg caaattacaa tcattctgat gaataattgt cctttagtgt ttatttgtct 2160  
 gtcacagagc aatcagagtt ctatttccct agagctccat taaattcaaa tgctatgttg 2220  
 tccactgagt ccatgatgag tagaattgca gctggagact tggagtcac agtggatgat 2280  
 10 cccagatcag aggaggacag aagatttgag agtcatatag aatgtaggaa accatataaa 2340  
 gaattgagac tggaggttgg gaaacaaaga atcaaatactg ctcaggaaga gttatcaaat 2400  
 gaagtgcctc cacctcctag gaaaatgaag gggttatttt cacaagctga attcctgcag 2460  
 cccgggggat ccatgggaat ttcagatgat gacaatgata gtgcagtagc tgagtttttc 2520  
 cggctctttc catctggtga accatcaaat tccaagtatt ctagtttttt ccaagctgtc 2580  
 actaatcaca agtgggttgc tgtgggagct gcagttggtt ttcttggatt gctagtggga 2640  
 15 ggatggtttg tgtataagca tttttccgc aaagaggaag aaccaattcc agctgttggg 2700  
 gtttatcatg gactgactaa gcccaaaca gtgattaaat tggatgcaga tccagtagag 2760  
 tctcagttga ctctagaaat agcaggatta gttaggaaaa atttggttca gtttggagtt 2820  
 ggtgagaaaa atggatgtgt gagatgggtc atgaatgcct taggagtga ggatgattgg 2880  
 ttgttagtac cttctcatgc ttataaattt gaaaaggatt atgaaatgat ggagttttat 2940  
 20 ttcaatagag gtggaactta ctattcaatt tcagctggtt atgttggtat tcaatcttta 3000  
 gatgtgggat tccaagatgt tgttctaatt aaggttccta caattcccaa gtttagagat 3060  
 attactcaac attttattaa gaaaggagat gtgcctagag ccttgaatcg cttggcaaca 3120  
 ttagtgacaa ccgttaattg aactcctatg ttaatttctg agggaccttt aaaaatggaa 3180  
 gaaaaagcca cttatgttca taagaagaat gatggtacta cggttgattt gactgtagat 3240  
 25 caggcatgga gaggaaggg tgaaggtcct cctggaatgt gtgggtgggc cctagtgtca 3300  
 tcaaatcagt ccatacaaaa tgcaattttg ggtattcatg ttgctggagg aaattcaatt 3360  
 cttgtggcaa agttgattac tcaagaaatg tttcaaaaaca ttgataagaa aattgaaatc 3420  
 aagctt 3426

30 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(19)  
 <223> Secuencia # 18.  
 40 Fragmento sintético que corresponde a la secuencia  
 nucleotídica de la señal de retención en el  
 retículo endoplasmático (KDEL).

<400> 18  
 45 atcaaggatg aattgtaat 19

<210> 19  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 55 <222> (1)..(21)  
 <223> Secuencia # 19.  
 Fragmento sintético que corresponde a la secuencia  
 nucleotídica de la señal de retención en el  
 retículo endoplasmático (KDEL).

60 <400> 19  
 cgattacaat tcataccttga t 21

5 <210> 20  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <221> D\_segment  
 10 <222> (1)..(54)  
 <223> Secuencia # 20  
 Fragmento sintético que modifica el extremo 3' de  
 la proteína 2A introduce un espaciador entre ésta  
 y la señal KDEL.  
 15 <400> 20  
 cctaggaaaa tgaaggggtt atatgcttct ggaggtgaat tcgatatcaa ggatg 55  
  
 20 <210> 21  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <221> D\_segment  
 <222> (1)..(54)  
 <223> Secuencia # 21.  
 Fragmento sintético que modifica el extremo 3' de  
 30 la proteína 2A introduce un espaciador entre ésta  
 y la señal KDEL.  
 <400> 21  
 aattcatcct tgatatcgaa ttcacctcca gaagcatata accccttcat ttctc 54  
 35  
  
 <210> 22  
 <211> 2555  
 <212> ADN  
 40 <213> Hepatitis A virus  
  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> Complement((1)..(2555))  
 45 <223> Secuencia # 22.  
 Secuencia que codifica para las proteínas  
 estructurales (P1-2A) unidas a la señal de  
 retención en el retículo endoplasmático.  
  
 50 <400> 22  
 atgaatatgt ccaaacaagg aatthttccag actggttgga gtggccttga ccacatcctg 60  
 tccttggcag atattgagga agagcaaagt attcagtcctg ttgataggac tgcagtgact 120  
 ggagcttctt atttcacttc tgtggaccaa tcttcagttc atactgctga ggttgggtca 180  
 caccaaaattg aacctttgaa aacctctggt gataaacctg gttctaagaa aactcagggg 240  
 55 gagaagtthtt tcttgattca ttctgctgat tggctcacta cacatgctct ctttcatgaa 300  
 gttgcaaaat tggatgtggt gaaactgctg tacaatgagc agtttgccgt ccaaggthttg 360  
 ttgagatacc atacttatgc aagatttggtc attgagattc aagttcagat aaatcccaca 420  
 ccctttcagc aaggaggact aatctgtgcc atgggttcctg gtgaccaaag ttatggttca 480  
 atagcatcct tgactgttta tctcatggtt ctgttaaatt gcaatatcaa caatgtagtt 540  
 60 agaataaagg ttccatttat ttatactaga ggtgcttatt attttaaaga tccacagttc 600  
 ccagtttggg aattgacaat cagagtttgg tcagagttga atattggaac aggaacctca 660  
 gcttatactt cactcaatgt tttagctagg tttacagatt tggagttgca tggattaaet 720

```

cctcttttcta cacagatgat gagaaatgaa tttagagtta gtactactga aaatgttgta 780
aatttgtcaa attatgaaga tgcaagggca aaaatgtcct ttgcttttga tcaggaagat 840
tggaagtctg atccttccca aggtgggtga attaaaatta ctcatctcac tacctggaca 900
tccattccaa ccttagctgc tcagtttcca ttcaatgctt cagattcagt tgggcaacaa 960
5 attaaagtta taccagtga ccatacttt ttccagatga caaacactaa tccatgatca 1020
aaatgtataa cagccttggc ctctatttgt cagatgttct gcttttggag gggagatcct 1080
gttttcgatt tccaggtttt tccaaccaa tatcattcag gtaggctgtt gttttgtttt 1140
gttcctggga atgagttaat agatgttact ggaattacat taaaacaggc aactactgct 1200
ccttgtgcag tgatggacat tacaggagtg cagtcacact tgagatttcg tgttccttgg 1260
10 atttctgata caccctatcg agtgaatagg tacacgaagt cagcacatca aaaagggtgag 1320
tatactgccca ttgggaagct tattgtgtat tgttataata gattgacttc tccttctaata 1380
gttgcttctc atgttagagt taatgtttat ctttcagcaa ttaatttga atgttttgc 1440
cctctttacc ctcttatgga tgttaccaca caggttggag atgattcagg aggttttctca 1500
acaacagttt ctacagagca gaatgttcct gatccccaag ttggcataac aacctagagg 1560
15 gatttaaaag ggaaagccaa taggggaaag atggatgtat caggagtgcg ggtacctgtg 1620
ggagctatta caacaattga ggatccagtt ttagcaaaga aagtacctga gacatttcct 1680
gaattgaagc ctggagaatc cagacataca tcagatcaca tgtctattta taaattcatg 1740
ggaaggtctc atttcttgtg tacttttact tttaattcaa acaataaaga gtacacattt 1800
ccaataactc tgtcttcgac ttctaactct cctcatgggt taccatcaac attaggtgg 1860
20 tcttttaatt tgtttcagtt gtatagagga ccattggatt tgacaattat aatcacagga 1920
gccactgatg ttgatgggtat ggcttgggtt actccagtgg gccttgctgt cgacacccct 1980
tggttggaaa agaagtcagc tttgtctatt gattataaaa ctgcccttgg agctgttaga 2040
tttaatacaa gaagaacagg gaacattcag attagattgc catgggtattc ttatttgtat 2100
gccgtgtctg gagcactgga tggcttggga gataagacag attctacatt tggattgggt 2160
25 tctattcaga ttgcaaatta caatcattct gatgaatatt tgctcctttag ttgttatttg 2220
tctgtcacag agcaatcaga gttctatttc ctagagctc cattaaattc aaatgctatg 2280
ttgtccactg agtccatgat gagtagaatt gcagctggag acttggagtc atcagtggat 2340
gatcccatg cagaggagga cagaagattt gagagtcata tagaatgtag gaaaccatat 2400
aaagaattga gactggaggt tgggaaacaa agaatcaaat atgctcagga agagttatca 2460
30 aatgaagtgc ttccacctcc taggaaaatg aaggggttat atgcttctgg aggtgaattc 2520
gatatcaagg atgaattgta atcgataccg tcgac 2555

```

```

<210> 23
35 <211> 1012
    <212> ADN
    <213> Hepatitis A virus

```

```

<220>
40 <221> gene
    <222> Complement((1)..(1012))
    <223> Secuencia # 23.
        Secuencia que codifica para la poliprotina 3ABC y
        la señal de retención en el retículo
45 endoplasmático.

```

```

<400> 23
gaattcctgc agcccgggg atccatggga atttcagatg atgacaatga tagtgcatga 60
gctgagtttt tccggtcttt tccatctggt gaaccatcaa attccaagtt atctagtttt 120
50 ttccaagctg tcaactaatca caagtgggtt gctgtgggag ctgcagttgg tattcttggg 180
ttgctagtgg gaggatgggt tgtgtataag catTTTTTccc gcaaagagga agaaccaatt 240
ccagctgttg gggtttatca tggagtgact aagcccaaac aagtgattaa attggatgca 300
gatccagtag agtctcagtt gactctagaa atagcaggat tagttaggaa aaatttgggt 360
cagtttggag ttggtgagaa aaatggatgt gtgagatggg tcatgaatgc cttaggagtg 420
55 aaggatgatt ggttgtagt accttctcat gcttataaat ttgaaaagga ttatgaaatg 480
atggagtttt atttcaatag aggtggaact tactattcaa tttcagctgg taatgttgtt 540
attcaatctt tagatgtggg attccaagat gttgttctaa tgaaggttcc tacaattccc 600
aagtttagag atattactca acattttatt aagaaaggag atgtgcctag agccttgaat 660
cgcttggcaa cattagtgc aaccgttaat ggaactccta tgttaatttc tgagggacct 720
60 ttaaaaatgg aagaaaaagc cacttatggt cataagaaga atgatggtac tacggttgat 780
ttgactgtag atcaggcatg gagaggaaaa ggtgaaggtc ttcttggaaat gtgtgggtgg 840
gccctagtgt catcaaatca gtccatacaa aatgcaattt tgggtattca tgttgcctga 900

```

ggaaattcaa ttcttgtggc aaagttgatt actcaagaaa tgtttcaaaa cattgataag 960  
 aaaattgaaa tcaagcttcg acctcgaatc aaggatgaat tgtaatcgat ac 1012

5 <210> 24  
 <211> 2492  
 <212> ADN  
 <213> Hepatitis A virus

10 <220>  
 <221> gene  
 <222> Complement((1)..(2492))  
 <223> Secuencia que codifica para la región estructural,  
 exceptuando a la proteína VP4, fusionada a la  
 15 señal de retención en el retículo endoplasmático.

<400> 24  
 gggatggata ttgaggaaga gcaaatgatt cagtcggtt ataggactgc agtgactgga 60  
 gcttcttatt tcacttctgt ggaccaatct tcagttcata ctgctgaggt tggctcacac 120  
 20 caaattgaac ctttgaaaac ctctgttgat aaacctggtt ctaagaaaac tcagggggag 180  
 aagtttttct tgattcattc tgctgattgg ctactacac atgctctctt tcatgaagtt 240  
 gcaaaattgg atgtggtgaa actgctgtac aatgagcagt ttgccgtcca aggtttgttg 300  
 agataccata cttatgcaag atttggcatt gagattcaag ttcagataaa tcccacaccc 360  
 tttcagcaag gaggactaat ctgtgccatg gttcctggtg accaaagtta tggttcaata 420  
 25 gcatccttga ctgtttatcc tcatggctctg ttaaattgca atatcaacaa tgtagttaga 480  
 ataaaggttc catttattta tactagaggt gcttatcatt ttaaagatcc acagtaccca 540  
 gtttgggaat tgacaatcag agtttggca gatgtgaata ttggaacagg aacctcagct 600  
 tatacttcac tcaatgtttt agctagggtt acagatttgg agttgcatgg attaaactcct 660  
 ctttctacac agatgatgag aaatgaattt agagtttagta ctactgaaaa tgttgtaaat 720  
 30 ttgtcaaatt atgaagatgc aagggcaaaa atgtcttttg ctttggatca ggaagattgg 780  
 aagtctgatc cttcccaagg tgggtggaatt aaaattactc atttcactac ctggacatcc 840  
 attccaacct tagctgctca gtttccattc aatgcttcag attcagttgg gcaacaaaatt 900  
 aaagttatac cagtggaccc atacttttct cagatgacaa acactaatcc tgatcaaaaa 960  
 tgtataacag ccttggcctc tatttctgct tttggagggg agatcttgtt 1020  
 35 ttogatttcc aggtttttcc aaccaaatat cattcaggta ggctgttgtt ttgttttgtt 1080  
 cctgggaatg agttaataga tgttactgga attacattaa aacaggcaac tactgctcct 1140  
 tgtgcagtga tggacattac aggagtgcag tcaaccttga gatttctgtt tccctggatt 1200  
 tctgatacac cctatcgagt gaataggtag acgaagtcag cacatcaaaa aggtgagtag 1260  
 actgccattg ggaagcctat tgtgtattgt tataatagat tgacttctcc ttctaattgtt 1320  
 40 gcttctcatg tttaggttaa tgtttatctt tcagcaatta atttggaatg ttttgcctct 1380  
 ctttaccatg ctatggatgt taccacacag gttggagatg attcaggagg tttctcaaca 1440  
 acagtttcta cagagcagaa tgttcctgat cccaagtgtg gcataacaac catgagggat 1500  
 ttaaaaggga aagccaatag gggaaagatg gatgtatcag gagtgcaggt acctgtggga 1560  
 gctattacaa caattgagga tccagtttta gcaaagaaag tacctgagac atttcctgaa 1620  
 45 ttgaagcctg gagaatccag acatacatca gatcacatgt ctatttataa attcatggga 1680  
 aggtctcatt tcttgtgtac ttttactttt aattcaaaca ataaagagta cacatttcca 1740  
 ataactctgt cttcgacttc taatcctcct catgggtttac catcaacatt aaggtgggtc 1800  
 ttttaatttgt ttcagttgta tagaggacca ttggatttga caattataat cacaggagcc 1860  
 actgatgtgg atggtatggc ctggtttact ccagtgggcc ttgctgtcga caccoccttg 1920  
 50 gtggaaaaga agtcagcttt gtctattgat tataaaactg cccttgagac tgtagatttt 1980  
 aatacaagaa gaacaggga cttcagatt agattgccat ggtattctta tttgtatgcc 2040  
 gtgtctggag cactggatgg cttgggagat aagacagatt ctacatttgg attggtttct 2100  
 attcagattg caaattacaa tcattctgat gaatatattgt cctttagttg ttatttgtct 2160  
 gtcacagagc aatcagagtt ctatttccct agagctccat taaattcaaa tgctatgttg 2220  
 55 tccactgagt ccatgatgag tagaattgca gctggagact tggagtcac agtggtgat 2280  
 cccagatcag aggaggacag aagattttag agtcatatag aatgtaggaa accatataaa 2340  
 gaattgagac tggaggttgg gaaacaaaga atcaaatatg ctcaggaaga gttatcaaat 2400  
 gaagtgtctc cacctcctag gaaaatgaag gggttatatg cttctggagg tgaattcgat 2460  
 atcaaggatg aattgtaatc gataccgtcg ac 2492

60

REIVINDICACIONES  
JUN 20 2005 Rec'd PCT/PTO 2 3 JUN 2005

1. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A caracterizado porque son obtenidos en células vegetales a partir de construcciones genéticas que contienen genes quiméricos del VHA basados en fragmentos modificados del genoma SEQ ID NO 3.
2. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene solamente pentámeros.
3. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 1 y 2 caracterizado porque se obtienen a partir de la expresión de un gen quimérico según la SEQ ID NO 17 que contiene la fusión de los elementos siguientes:
  - a. Un secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas VP2, VP3, VP1 y 2A SEQ ID NO 25
  - b. Un secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas 3A, 3B, 3C, Seq. Id No.13
4. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 3 caracterizado porque el gen quimérico se expresa en células vegetales regulado por señales promotoras y de terminación apropiadas.
5. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 4 caracterizado porque se obtienen en el citosol de la célula vegetal.
6. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 5 caracterizado porque se expresan en plantas dicotiledóneas.
7. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 6 caracterizado porque se expresa en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles.
8. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 5 caracterizado porque se expresa en plantas monocotiledóneas.
9. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 8 caracterizado porque se expresa en arroz y en frutos de plantas comestibles.
10. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene pentámeros y envolturas vacías.
11. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 10 caracterizado porque se obtuvo a partir de la expresión de un gen quimérico que contiene la fusión de los dos elementos siguientes:
  - a. Un secuencia nucleotídica según la SEQ ID NO 6 que codifica para las proteínas VP4, VP2, VP3, VP1 y 2A.

- b. Una secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas 3A, 3B, 3C, según la reivindicación 3b.
12. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 11 caracterizado porque el gen quimérico se expresa en la célula vegetal regulado por señales promotoras y de terminación apropiadas.
13. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 12 caracterizado porque se obtienen en el citosol de la célula vegetal.
14. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 13 caracterizado porque se obtienen en plantas dicotiledóneas.
15. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 14 caracterizado porque se expresa en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles.
16. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 13 caracterizado porque se expresa en plantas monocotiledóneas.
17. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 16 caracterizado porque se expresa en arroz y en frutos de plantas comestibles.
18. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 2 caracterizado porque se obtienen a partir de la expresión coordinada de dos genes quiméricos:
- a. Una secuencia nucleotídica, según la SEQ ID NO 24 que codifica para las proteínas VP2, VP3, VP1, 2A, fusionada en su extremo 5' a una secuencia señal y por su extremo 3' a una secuencia espaciadora seguido de la secuencia que codifica para el péptido KDEL.
- b. Una secuencia nucleotídica, según la SEQ ID NO 23 que codifica para las proteínas 3A, 3B, 3C, referidas en la reivindicación 3b, fusionadas en su extremo 5' a una secuencia señal y por su extremo 3' a una secuencia espaciadora seguido de la secuencia que codifica para el péptido KDEL.
19. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 18 caracterizado porque los genes quiméricos se expresan en la célula vegetal regulados por señales promotoras y de terminación apropiadas.
20. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 18 y 19 caracterizado porque se obtienen en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.
21. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 20 caracterizado porque se obtienen en plantas dicotiledóneas.
22. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 21 caracterizado porque se obtienen en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles

23. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 20 caracterizado porque se obtienen en plantas monocotiledóneas.
24. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 23 caracterizado porque se obtienen en arroz. y en frutos de plantas comestibles
- 5 25. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 10 caracterizado porque se obtienen a partir de la expresión coordinada de dos genes quiméricos:
- a. Un secuencia nucleotídica, según la SEQ ID NO 22 que codifica para las proteínas VP4, VP2, VP3, VP1, 2A, fusionada en su extremo 5' a una
- 10 secuencia señal y por su extremo 3' a una secuencia espaciadora y seguido de la secuencia que codifica para el péptido KDEL.
- b. Un secuencia nucleotídica, según la reivindicación 18 b.
26. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 25 caracterizados porque los genes quiméricos se expresan en la célula vegetal regulados por señales promotoras y de terminación apropiadas.
- 15 27. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 25 y 26 caracterizados porque se obtienen en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.
28. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 27
- 20 caracterizados porque se obtienen en plantas dicotiledóneas.
29. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 28 caracterizados porque se obtienen en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles
30. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 27
- 25 caracterizados porque se obtienen en plantas monocotiledóneas.
31. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 30 caracterizados porque se obtienen en arroz. y en frutos de plantas comestibles
32. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales pueden ser purificados para ser administrados por vía
- 30 parenteral.
33. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 32 que puede ser administrado en combinación con otros antígenos virales.
34. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales pueden ser administrados por vía oral.
- 35 35. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 34 los cuales pueden ser administrados en forma de extracto liofilizado, tableta o cápsula

36. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales pueden ser administrados en forma de jugo.
37. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales son inmunogénicos y levantan respuesta inmune protectora contra la hepatitis A.
38. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 32, los cuales pueden ser utilizados como parte de un sistema diagnóstico de la hepatitis A.
39. Uso de los antígenos según las reivindicaciones 1 a la 38 para preparar composiciones vacunales simples y combinadas.

Figura 1

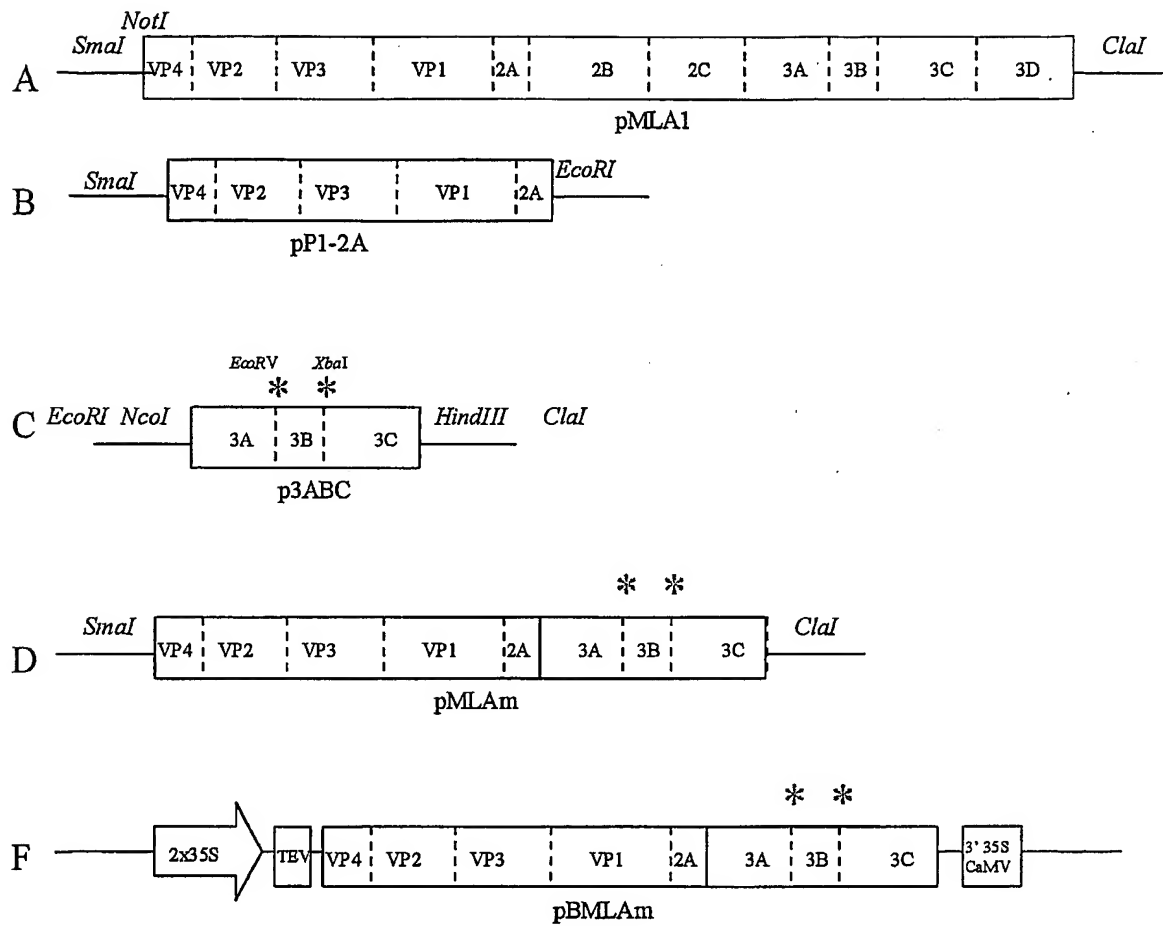


Figura 2

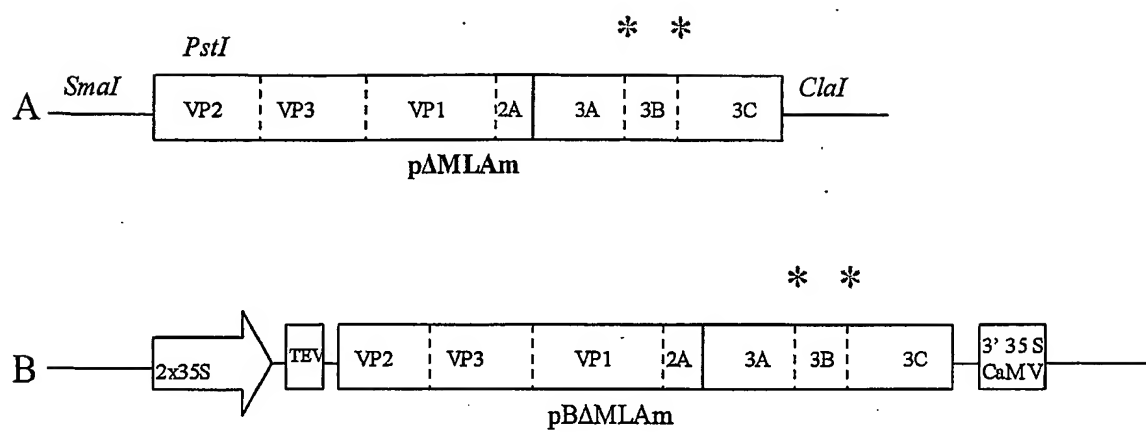


Figura 3

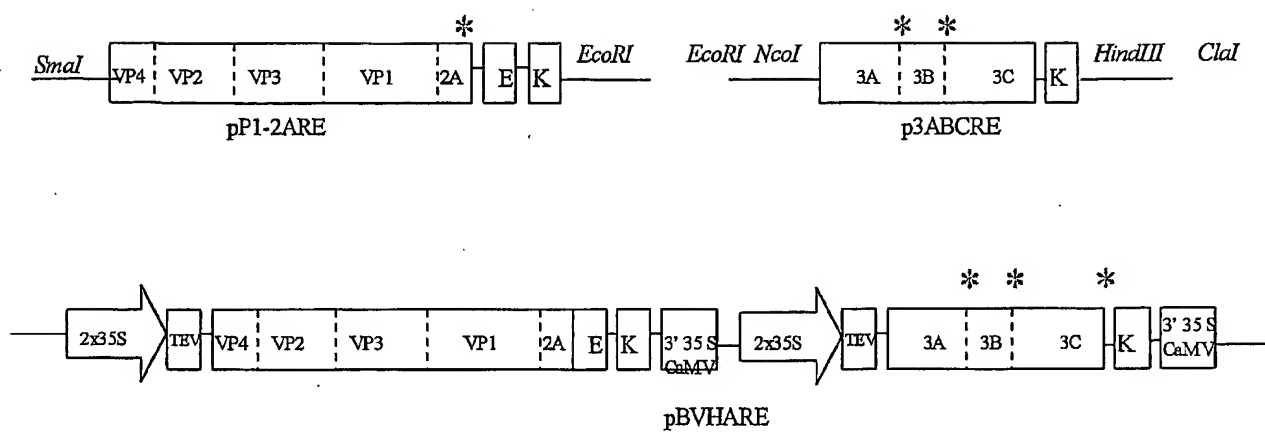


Figura 4

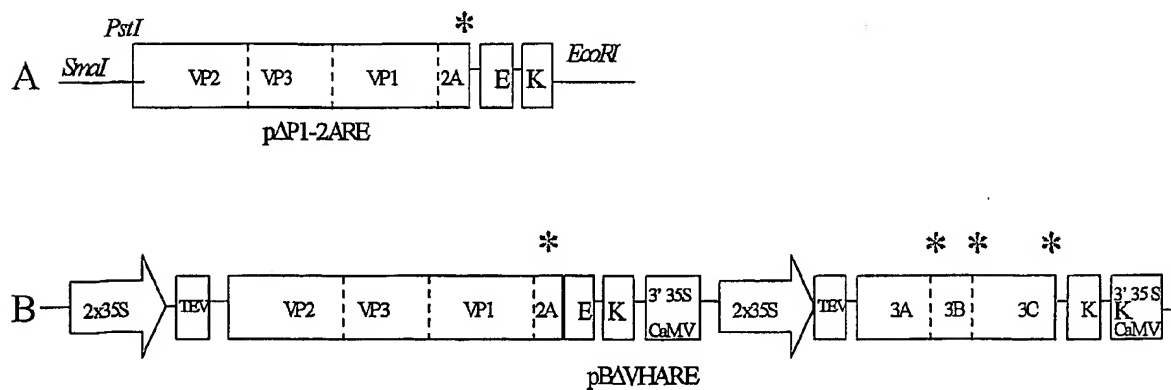


Figura 5

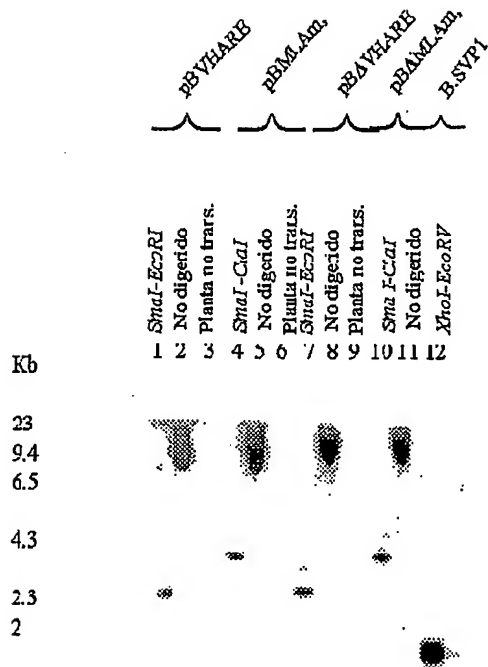


Figura 6

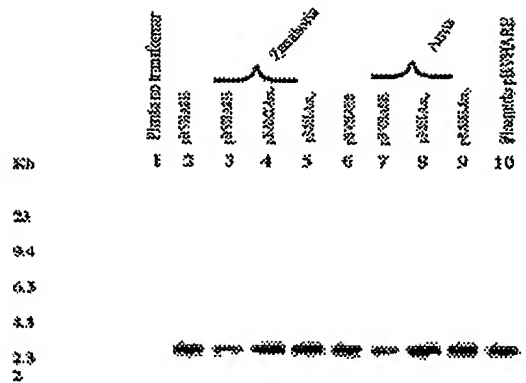


Figura 7

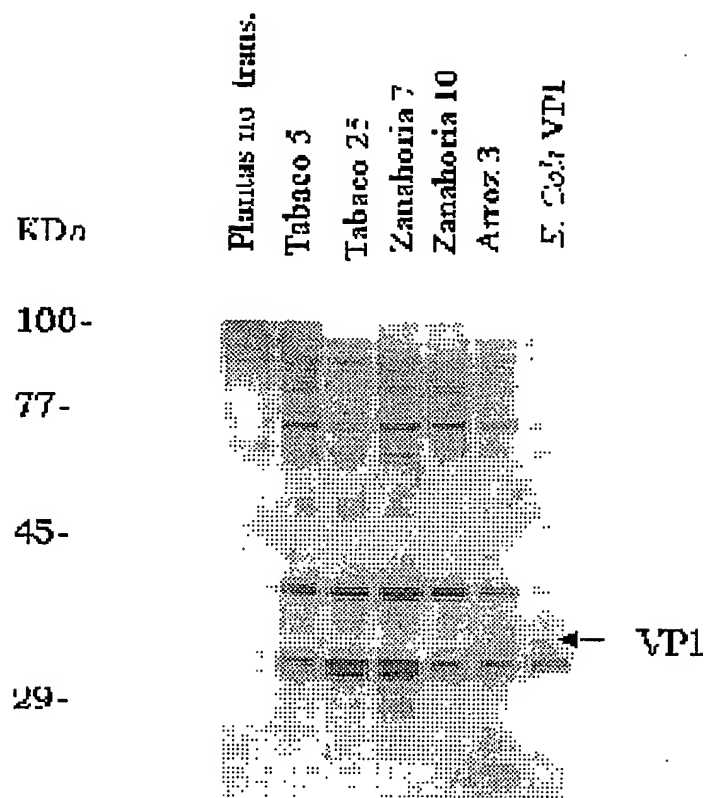


Figura 8

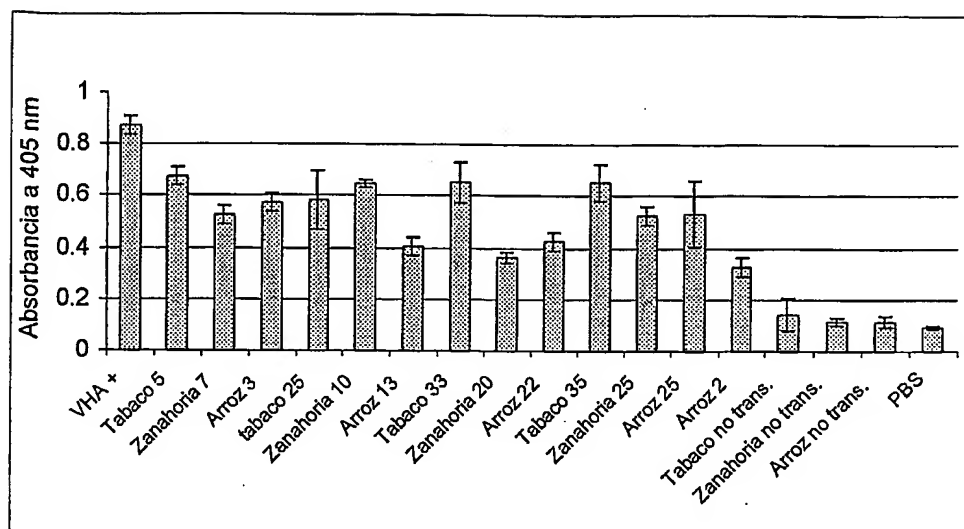


Figura 9

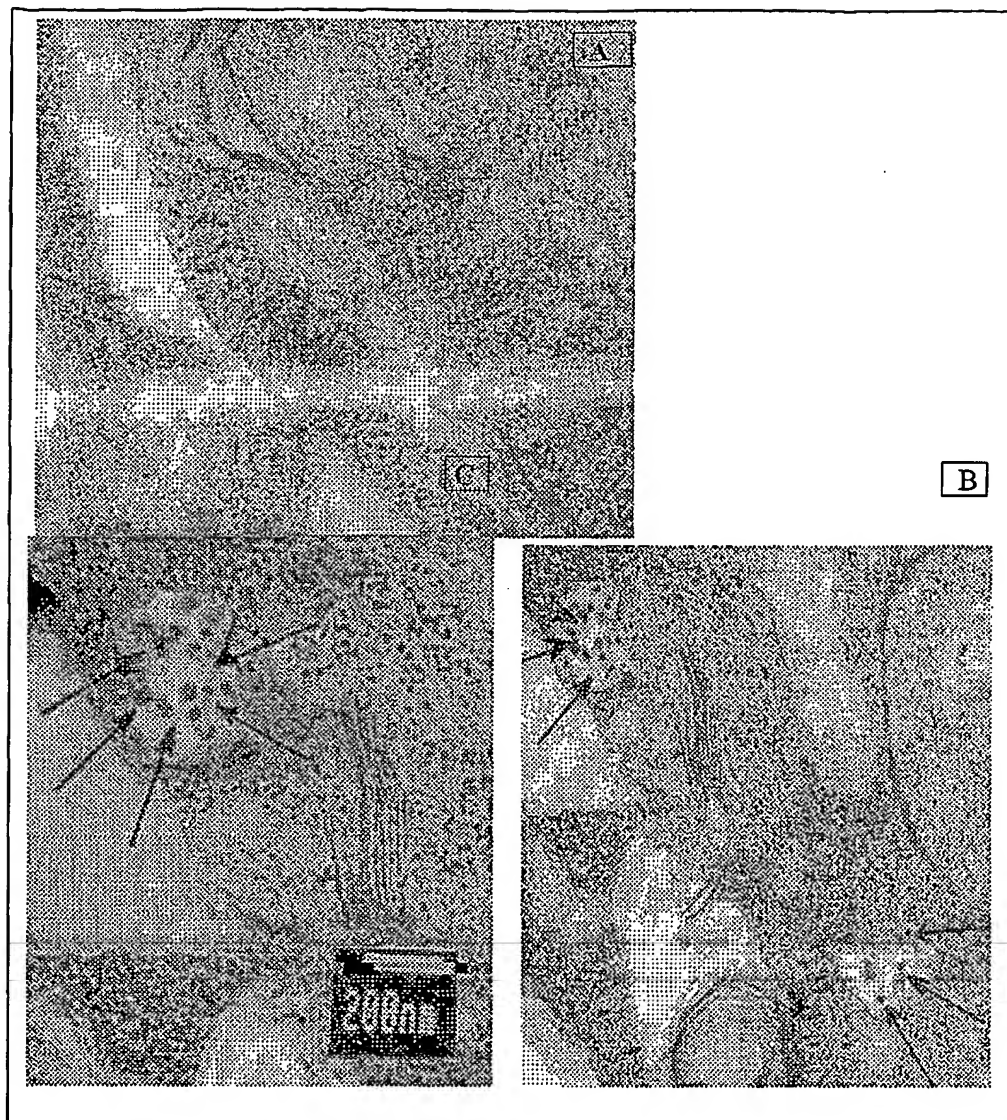


Figura 10

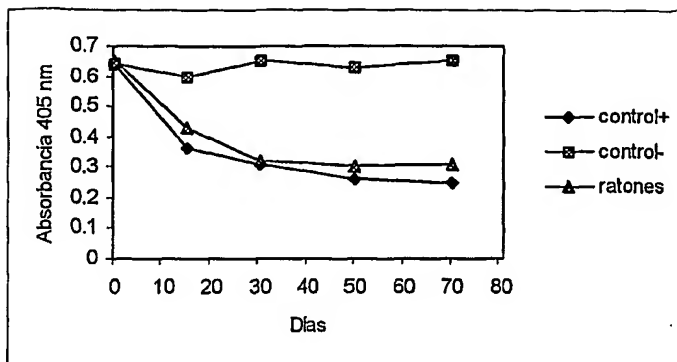


Figura 11

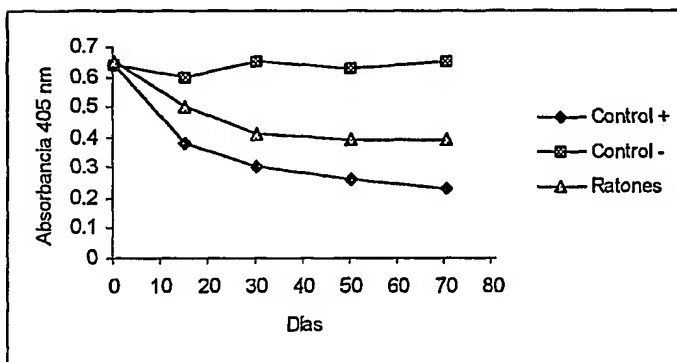
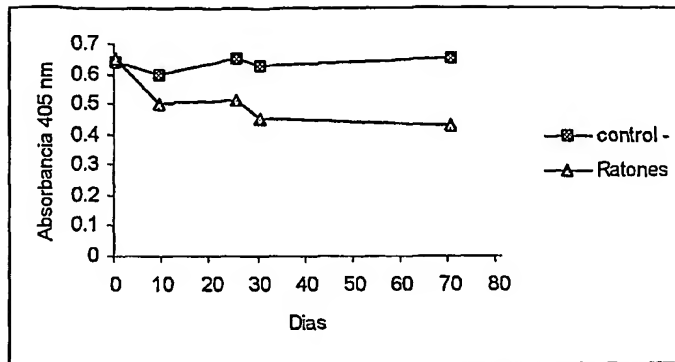


Figura 12

10/10



Receivido 2 JUN 2005

10/540615

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU 03/00017

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C07K14/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 276 330 A (INST POLIOMIELITA I VIRUSNYKH ;VNII MOLEKULARNOI BIOLOG (SU); INS) 3 August 1988 (1988-08-03) the whole document ---	1,3,11, 18,25
A	EP 0 138 704 A (MERCK & CO INC) 24 April 1985 (1985-04-24) the whole document ---	1,3,11, 18,25
A	WO 85/01517 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 11 April 1985 (1985-04-11) the whole document ---	1,3,11, 18,25
A	WO 93/09139 A (EMERSON SUZANNE U ;FEINSTONE STEPHEN M (US); BALTIMORE DAVID (US);) 13 May 1993 (1993-05-13) the whole document ---	1,3,11, 18,25
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

6 May 2004

Date of mailing of the International search report

26. 05. 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabriel González Limas

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CU 03/00017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/95933 A (GAUSS MUELLER VERENA ;GILAD MALI KETZINEL (IL); GALUN EITHAN (IL);) 20 December 2001 (2001-12-20) the whole document ---	1-39
A	WO 00/37610 A (RICHTER ELIZABETH ;MASON HUGH S (US); ARNTZEN CHARLES JOEL (US); H) 29 June 2000 (2000-06-29) the whole document ---	1-39
A	US 6 136 320 A (ARNTZEN ET AL) 24 October 2000 (2000-10-24) the whole document -----	1-39

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CU 03/00017

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 3  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 3

SEQ ID No. 25 does not appear in the Sequence listings.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU 03/00017

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0276330	A	03-08-1988	SU 1469856 A1	30-09-1990
			EP 0276330 A1	03-08-1988
			JP 1500485 T	23-02-1989
			WO 8800973 A1	11-02-1988
EP 0138704	A	24-04-1985	US 4614793 A	30-09-1986
			DE 3485948 D1	05-11-1992
			DE 3485948 T2	22-04-1993
			EP 0138704 A2	24-04-1985
			JP 60104020 A	08-06-1985
WO 8501517	A	11-04-1985	AT 61408 T	15-03-1991
			DE 3484244 D1	11-04-1991
			EP 0162054 A1	27-11-1985
			JP 61500053 T	16-01-1986
			WO 8501517 A1	11-04-1985
			US 5849562 A	15-12-1998
			US 5516630 A	14-05-1996
WO 9309139	A	13-05-1993	US 5516630 A	14-05-1996
			AU 3124093 A	07-06-1993
			WO 9309139 A1	13-05-1993
			US 5849562 A	15-12-1998
WO 0195933	A	20-12-2001	US 6368602 B1	09-04-2002
			AU 6628801 A	24-12-2001
			CA 2412343 A1	20-12-2001
			EP 1289547 A2	12-03-2003
			WO 0195933 A2	20-12-2001
			JP 2004503510 T	05-02-2004
			US 2003190332 A1	09-10-2003
WO 0037610	A	29-06-2000	AU 2594900 A	12-07-2000
			BR 9916522 A	24-12-2002
			CA 2357004 A1	29-06-2000
			CN 1378553 T	06-11-2002
			EP 1230257 A2	14-08-2002
			JP 2003512812 T	08-04-2003
			WO 0037610 A2	29-06-2000
			US 2004086530 A1	06-05-2004
			US 6551820 B1	22-04-2003
US 6136320	A	24-10-2000	US 5914123 A	22-06-1999
			US 5612487 A	18-03-1997
			US 5484719 A	16-01-1996
			US 2001053367 A1	20-12-2001
			US 2003138456 A1	24-07-2003
			US 2002006411 A1	17-01-2002
			AU 6813394 A	26-09-1994
			EP 0728014 A1	28-08-1996
			WO 9420135 A1	15-09-1994
			US 6034298 A	07-03-2000

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00017

## A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN

CIP 7 C12N15/82 C07K14/10

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 C12N C07K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	EP 0 276 330 A (INST POLIOMIELITA I VIRUSNYKH ;VNII MOLEKULYARNOI BIOLOG (SU); INS) 3 Agosto 1988 (1988-08-03) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
A	EP 0 138 704 A (MERCK & CO INC) 24 Abril 1985 (1985-04-24) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
A	WO 85/01517 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 11 Abril 1985 (1985-04-11) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
A	WO 93/09139 A (EMERSON SUZANNE U ;FEINSTONE STEPHEN M (US); BALTIMORE DAVID (US);) 13 Mayo 1993 (1993-05-13) el documento completo --- -/-	1,3,11, 18,25

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

\* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

6 Mayo 2004

Fecha de expedición del presente Informe de búsqueda internacional

26. 05. 2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Funcionario autorizado

Gabriel González Limas

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00017

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
A	WO 01/95933 A (GAUSS MUELLER VERENA ;GILAD MALI KETZINEL (IL); GALUN EITHAN (IL);) 20 Diciembre 2001 (2001-12-20) el documento completo ---	1-39
A	WO 00/37610 A (RICHTER ELIZABETH ;MASON HUGH S (US); ARNTZEN CHARLES JOEL (US); H) 29 Junio 2000 (2000-06-29) el documento completo ---	1-39
A.	US 6 136 320 A (ARNTZEN ET AL) 24 Octubre 2000 (2000-10-24) el documento completo -----	1-39

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00017

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0276330 A	03-08-1988	SU 1469856 A1 EP 0276330 A1 JP 1500485 T WO 8800973 A1	30-09-1990 03-08-1988 23-02-1989 11-02-1988
EP 0138704 A	24-04-1985	US 4614793 A DE 3485948 D1 DE 3485948 T2 EP 0138704 A2 JP 60104020 A	30-09-1986 05-11-1992 22-04-1993 24-04-1985 08-06-1985
WO 8501517 A	11-04-1985	AT 61408 T DE 3484244 D1 EP 0162054 A1 JP 61500053 T WO 8501517 A1 US 5849562 A US 5516630 A	15-03-1991 11-04-1991 27-11-1985 16-01-1986 11-04-1985 15-12-1998 14-05-1996
WO 9309139 A	13-05-1993	US 5516630 A AU 3124093 A WO 9309139 A1 US 5849562 A	14-05-1996 07-06-1993 13-05-1993 15-12-1998
WO 0195933 A	20-12-2001	US 6368602 B1 AU 6628801 A CA 2412343 A1 EP 1289547 A2 WO 0195933 A2 JP 2004503510 T US 2003190332 A1	09-04-2002 24-12-2001 20-12-2001 12-03-2003 20-12-2001 05-02-2004 09-10-2003
WO 0037610 A	29-06-2000	AU 2594900 A BR 9916522 A CA 2357004 A1 CN 1378553 T EP 1230257 A2 JP 2003512812 T WO 0037610 A2 US 2004086530 A1 US 6551820 B1	12-07-2000 24-12-2002 29-06-2000 06-11-2002 14-08-2002 08-04-2003 29-06-2000 06-05-2004 22-04-2003
US 6136320 A	24-10-2000	US 5914123 A US 5612487 A US 5484719 A US 2001053367 A1 US 2003138456 A1 US 2002006411 A1 AU 6813394 A EP 0728014 A1 WO 9420135 A1 US 6034298 A	22-06-1999 18-03-1997 16-01-1996 20-12-2001 24-07-2003 17-01-2002 26-09-1994 28-08-1996 15-09-1994 07-03-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**